

Голосова Ольга Станиславовна

СОВРЕМЕННАЯ СТРУКТУРА БЛАГОРОДНОГО ОЛЕНЯ (*CERVUS ELAPHUS SENSU LATO*) РОССИИ: ГЕНЕТИЧЕСКИЙ И АКУСТИЧЕСКИЙ АСПЕКТЫ

1.5.12 – Зоология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой  
степени кандидата биологических  
наук

Москва, 2024

Работа выполнена в Кабинете методов молекулярной диагностики Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук»

**Научный руководитель:** **Холодова Марина Владимировна**  
доктор биологических наук, главный научный сотрудник, руководитель Кабинета методов молекулярной диагностики ФГБУН «Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук»

**Официальные оппоненты:** **Марова-Кляйнбуб Ирина Михайловна**  
доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник Кафедры зоологии позвоночных ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»

**Тирронен Константин Феликсович**  
кандидат биологических наук, заведующий Лабораторией зоологии Института биологии ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Карельский научный центр Российской академии наук»

**Ведущая организация:** ФГБУН «Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук» (г. Москва)

Защита состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2024 года в \_\_\_ часов \_\_\_ минут на заседании диссертационного совета 24.1.109.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук по адресу: 119071, г. Москва, Ленинский проспект, д. 33.

Тел/факс: +7(495)952-35-84, e-mail: admin@sevin.ru

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке Отделения биологических наук Российской академии наук по адресу: 119071, г. Москва, Ленинский проспект, д. 33, на сайте ФГБУН ИПЭЭ РАН по адресу: [www.sev-in.ru](http://www.sev-in.ru) и на сайте Высшей аттестационной комиссии по адресу: [vak.minobrnauki.gov.ru](http://vak.minobrnauki.gov.ru)

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2024 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
кандидат биологических наук

Е.А. Кацман

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность исследования

Благородный олень *Cervus elaphus sensu lato* (*s. l.*) обладает обширным ареалом, высокой внутривидовой изменчивостью и экологической пластичностью (Гептнер и др., 1961). Являясь одним из наиболее распространенных и крупных растительноядных представителей мегафауны Голарктики, он играет важную роль в экологии сообществ и обладает высоким хозяйственным и промысловым значением (Гептнер, Цалкин, 1947; Данилкин, 1999). На данный момент благородного оленя *C. elaphus s.l.* все чаще рассматривают как видовой комплекс, включающий три вида: восточный благородный олень *C. canadensis*, европейский благородный олень *C. elaphus* и центральноазиатский благородный олень *C. hanglu* (Павлинов, Лисовский, 2012; Lorenzini, Garofalo, 2015; Doan et al., 2018, 2021; Mackiewicz et al., 2022). Начиная с римских времен и по сей день благородный олень подвержен сильному антропогенному воздействию, которое выражается не только в охотничьем прессе, но и в постоянных транслокациях и интродукциях (Zachos, Hartl, 2011). Так как структура видového комплекса довольно сложна и включает в себя множество разнообразных форм, подобные перемещения без учета видовой и подвидовой принадлежности могут привести (и уже привели в прошлом) к сильному нарушению естественной структуры видов и утрате редких подвидов (Гептнер, Цалкин, 1947; Данилкин, 1999; Skog et al., 2009; Niedzialkowska et al., 2011; Zachos, Hartl, 2011; Frantz et al., 2017). Отдельного внимания заслуживает возможная гибридизация европейского благородного и пятнистого *C. nippon* оленей, высокую вероятность которой надо учитывать при выпуске благородных оленей в природные условия (Zachos, Hartl, 2011).

На территории России обитает как европейский благородный олень (кавказский *C. e. maral* и воронежский, номинально относящийся к среднеевропейскому подвиду *C. e. hippelaphus*), так и восточный благородный олень (марал *C. c. sibiricus* и изюбрь *C. c. xanthopygus*) (Соколов, 1959; Данилкин, 1999; Павлинов, Лисовский, 2012). На данный момент состояние многих природных популяций благородного оленя России остается слабоизученным. К началу XX в. бесконтрольная охота привела к исчезновению природных популяций благородного оленя во многих районах как европейской, так и азиатской частей ареала (Данилкин, 1999). В середине прошлого века была запущена масштабная государственная программа по реакклиматизации благородного оленя, которая, с одной стороны, привела к практически полному восстановлению границ исторического ареала, но, с другой стороны, часто проводилась без учета видовой и подвидовой принадлежности животных (Павлов и др., 1974). В результате, на территории страны обитает множество популяций благородного оленя с неизвестным происхождением и неясным видовым (и подвидовым) статусом.

Необходимо отметить высокую акустическую изменчивость благородного оленя. Вокализации как самцов, так и самок сильно отличаются по основным частотно-временным параметрам у разных видов благородного оленя, а гонные крики самцов, к тому же, обладают подвидовой специфичностью (Никольский и др., 1979). Самцы восточного благородного оленя издают преимущественно одиночные гонные крики с высокой основной частотой, тогда как самцы европейского благородного оленя издают серии низкочастотных ревов при сходной длине вокального тракта (Frey, Riede, 2013; Reby et al., 2016). Центральноазиатский благородный олень, обитающий в центре происхождения вида, сохраняет в гонных криках и высокочастотную, и низкочастотную составляющие (Никольский и др., 1979). Причина подобного разделения до сих пор не известна. Скорее всего, она кроется в истории формирования видového комплекса: наличии двух основных частот у предковой формы (близкой к *C. hanglu*), утрате высокой основной частоты у *C. elaphus* и низкой – у *C. canadensis* (Никольский и др., 1979; Frey, Riede, 2013; Volodin et al., 2013b). Использование биоакустического подхода в изучении видов часто способствует лучшему пониманию их структуры и дополняет морфологические и генетические данные.

### Степень разработанности темы исследования

Генетике и акустике благородного оленя Европы и Северной Америки посвящено множество работ, однако благородный олень России слабо изучен как в генетическом, так и в акустическом плане. Генетическая структура благородного оленя России была частично изучена только на одном маркере – гене цитохрома *b* митохондриальной ДНК (мтДНК) (Кузнецова и др., 2012, 2013). В

западных исследованиях в лучшем случае присутствует несколько образцов с небольшой части ареала, часто – без указания точного географического происхождения образцов (Ludt et al., 2004; Skog et al., 2009; Niedzialkowska et al., 2011; Doan et al., 2018, 2021). Гонные вокализации благородного оленя России практически не изучены. Существует несколько ранних работ, включающих первое описание гонных криков кавказского благородного оленя, марала и изюбря (Никольский и др., 1979; Никольский, 1984; 2011). Ряд работ посвящен динамике гонной активности (Переладова, 1979, 1981; Volodin et al., 2013a; Володин и др., 2015). На современном уровне некоторые акустические параметры описаны для гонных криков марала (Volodin et al., 2013a, 2016a) и изюбря (Володин и др., 2015). Полного описания гонных вокализаций самцов благородного оленя России до сих пор не проводили. Исходя из вышеуказанных пробелов в изучении генетики и акустики благородного оленя *C. elaphus s. l.* России, мы определили направление данной работы.

### Цель и задачи работы

**Целью данной работы** стало описать современную структуру и разнообразие благородного оленя *C. elaphus s. l.* России по генетическим и акустическим характеристикам.

Для выполнения данной цели нами были поставлены следующие **задачи**:

1. Описать филогеографическую структуру благородного оленя России и оценить генетическое разнообразие по митохондриальному маркеру гену цитохрома *b*.
2. Оценить генетическое разнообразие благородного оленя России на основании полиморфизма аллелей микросателлитных локусов ядерной ДНК (ядНК).
3. На основании полученных данных разработать метод выявления особей/популяций смешанного происхождения и межвидовых гибридов.
4. Проанализировать структуру гонных вокализаций самцов благородного оленя России. Сравнить акустические параметры гонных вокализаций восточного и европейского благородных оленей разных подвидов.

### Научная новизна

В нашем исследовании впервые описана генетическая структура благородного оленя России на большой выборке с применением генетических маркеров с разной скоростью эволюции и типом наследования (мтДНК гена цитохрома *b* и микросателлитных локусов яДНК) с учетом происхождения популяций и истории транслокаций и интрогрессий. Впервые выявлены следы предкового полиморфизма или интрогрессии мтДНК изюбря в геном марала. Было определено происхождение якутской популяции восточного благородного оленя, ее неоднородность и близость к американским подвидам. Нами впервые было подтверждено обособленное относительно других европейских популяций положение воронежского и кавказского благородных оленей, и близость некоторых оленей с Северного Кавказа и реликтового оленя Мезолы *C.e. italicus* с Аппенинского полуострова. Был разработан и применен метод выявления гибридов европейского благородного и пятнистого оленей с использованием мтДНК и яДНК маркеров. Впервые было проведено подробное описание структуры гонных вокализаций благородного оленя России двух видов и четырех подвидов. Впервые были выявлены и описаны паттерны основной частоты гонных криков восточного благородного оленя и отмечен высокий процент содержания в их криках второй низкой основной частоты. Впервые было выявлено влияние условий содержания на параметры гонных криков восточного благородного оленя.

### Теоретическая и практическая значимость

Полученные в ходе работы данные существенно заполнили пробелы в исследовании генетики *C. elaphus s. l.* и структуры этого видового комплекса. Результаты данной работы расширяют знания в области микроэволюции крупных растительноядных млекопитающих. Выявленные характерные генетические и акустические черты восточного и европейского благородных оленей России могут служить основой для дальнейшего описания популяций благородного оленя, обитающих на территории нашей страны, уточнения их происхождения и видовой/подвидовой принадлежности. Разработанный метод выявления гибридов между европейским благородным и пятнистым оленями может быть использован при подозрении на межвидовую гибридизацию как в охотничьих хозяйствах, так и в природных популяциях.

## Методы исследования

Генетическая составляющая работы была проведена на базе Кабинета методов молекулярной диагностики в составе ЦКП «Инструментальные методы в экологии» ИПЭЭ РАН. В исследовании были использованы стандартные методы выделения тотальной ДНК из разных типов тканей с помощью коммерческих наборов, определения мтДНК последовательностей нуклеотидов методом секвенирования по Сэнгеру, определения длин фрагментов микросателлитных локусов яДНК с помощью электрофореза на капиллярном секвенаторе. Статистическая обработка результатов включала в себя оценку генетического разнообразия по мтДНК и яДНК маркерам, построение филогенетических деревьев методом Байеса и максимального правдоподобия, построение медианных сетей и кластеризацию выборок с использованием байесовских алгоритмов. Акустическая составляющая работы заключалась в первоначальном сборе материала с помощью автоматических звукозаписывающих систем с последующей визуализацией и расшифровкой данных с использованием специального программного обеспечения. Полученные параметры были проанализированы статистическими методами (одно- и двухфакторный дисперсионный анализ).

## Положения, выносимые на защиту

1. Современная филогеографическая структура восточного благородного оленя *C. canadensis* подтверждает роль Алтай-Саянского региона как центра распространения вида. Благородные олени Якутии образуют две митохондриальные линии, одна из которых генетически близка американским вапити, что позволяет выдвинуть предположение о сохранении в Якутии предковых гаплотипов, носители которых участвовали в заселении Северной Америки в эпоху плейстоценовых оледенений.

2. Филогенетический анализ с участием музейных образцов позволяет предположить, что на равнинах юга России сохранились остатки автохтонной восточноевропейской популяции европейского благородного оленя *C. elaphus*, ранее имевшей связь с кавказской популяцией и впоследствии смешавшейся с воронежским оленем *C. e. hippelaphus*. Кавказский благородный олень *C. e. maral* не является монофилетичным подвидом, и для части современных оленей Кавказа показана генетическая связь с реликтовым оленем Мезолы *C. e. italicus* с Апеннинского полуострова.

3. Различия в параметрах гонных вокализаций благородного оленя европейской и восточной частей ареала России ярко выражены и отражают сложную структуру видового комплекса *Cervus elaphus s. l.*

## Степень достоверности и апробация результатов

Результаты работы были представлены на 15 международных и российских конференциях: «VI Всемирный Конгресс мараловодов» (Усть-Каменогорск, Казахстан, 2014), «8th International Deer Biology Congress and International Wildlife Management Symposium» (Harbin, China, 2014), «Териофауна России и сопредельных территорий» (Москва, Россия, 2016), «8th European Conference of Behavioural Biology» (Vienna, Austria, 2016), «Актуальные вопросы современной зоологии и экологии животных» (Пенза, Россия, 2016), «11th International Conference on Behaviour, Physiology and Genetics of Wildlife» (Berlin, Germany, 2017), «VI Всероссийская конференция по поведению животных» (Москва, Россия, 2017), «2nd International Young Scientists Conference on Biodiversity and Wildlife Conservation Ecological Issues» (Цахкадзор, Армения, 2018), «Wildlife Research and Conservation» (Berlin, Germany, 2019), «9-я международная научно-практическая конференция «Сохранение разнообразия животных и охотничье хозяйство России» (Москва, Россия, 2021), «35th Congress of the International Union of Game Biologists» (Budapest, Hungary, 2021), «Международная научно-практическая конференция «Генетика, селекция, биотехнология: интеграция науки и практики в животноводстве» (Пушкин, Россия, 2021), «Млекопитающие в меняющемся мире: актуальные проблемы териологии (XI Съезд Териологического общества при РАН)» (Москва, Россия, 2022), «10-я Международная научно-практическая конференция «Сохранение разнообразия животных и охотничье хозяйство России» (Москва, Россия, 2023), «Вторая всероссийская конференция «Зоологические коллекции как источник генетических ресурсов мировой фауны – классические и современные подходы к их изучению, хранению и использованию» (Санкт-Петербург, Россия, 2023).

## Публикации

По теме диссертации было опубликовано 17 работ, в том числе, 4 статьи в рецензируемых журналах, входящих в перечень научных журналов ВАК и базу цитирования WoS, 1 статья в сборнике и 12 тезисов на международных и российских конференциях.

## Личный вклад соискателя

Большинство образцов для генетического анализа были взяты из коллекции Кабинета методов молекулярной диагностики ИПЭЭ РАН. Недостающие образцы были собраны автором лично или коллегами на местах. Все лабораторные процедуры и анализ полученных результатов были проведены автором лично. Установка звуковых ловушек для записи звуков была проведена автором частично самостоятельно, в остальных случаях звуки уже были собраны, но не были обработаны. Расшифровка данных, их визуализация и статистическая обработка проведены лично автором. Автором были написаны статьи (полностью или частично) по материалам диссертационной работы.

## Структура и объем работы

Диссертация состоит из введения, выводов и 4 глав (обзор литературы, материалы и методы, результаты исследования, обсуждение и заключение). Работа изложена на 243 страницах машинописного текста, включая 186 страниц основного текста и 57 страниц Приложений. Работа содержит 23 таблицы и 49 рисунков в основном тексте, 9 таблиц и 2 рисунка в Приложении. Список литературы включает 231 наименование, в том числе 183 на иностранных языках

## Благодарности

Автор выражает глубокую благодарность своему научному руководителю, д.б.н. М. В. Холодовой, а также И. А. Володину и Е. В. Володиной, В. В. Саломашкиной, В. А. Матросовой и коллегам из Кабинета методов молекулярной диагностики ИПЭЭ РАН: И. Г. Мещерскому, П. А. Сорокину, Е. Ю. Звычайной, Н. В. Кашининой, С. И. Мещерскому, Н. А. Соколовой, – за постоянную помощь и поддержку. Также автор благодарен сотрудникам Зоологического музея МГУ им. М.В. Ломоносова: Н.Н. Спасской, С.В. Крускопу, В.С. Лебедеву, – за доступ к музейным образцам, и Т.П. Сипко, И.В. Середкину, И.М. Охлопкову, А.В. Аргунову, Д.И. Галас, О.В. Сибиряковой, И.Л. Исаевой, Е. Ю. Лихацкому, С.А. Трепету, А.С. Мурадову, О. Н. Быхаловой, сотрудникам Кавказского заповедника и всем охотникам и коллегам, оказавшим помощь в сборе образцов и данных для акустического анализа.

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

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **ВВЕДЕНИИ** обоснованы актуальность и степень изученности избранной темы, определены цели и задачи исследования, приведены научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы и основные положения, выносимые на защиту.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В обзор литературы входят следующие разделы: «Биология и распространение благородного оленя»; «Использование молекулярно-генетических методов в современных зоологических исследованиях и выбор актуальных маркеров»; «Современный взгляд на систематику и филогению благородного оленя»; «Филогеография благородного оленя», «Благородный олень России», «Особенности звукопродукции благородного оленя», «Акустические параметры вокализаций разных форм *C. elaphus s. l.*», «Гибридизация благородного и пятнистого оленей».

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Генетический анализ

В анализ вошло 228 образцов восточного и европейского благородных оленей из России и Европы из коллекции кабинета методов молекулярной диагностики ИПЭЭ РАН, Зоологического музея МГУ им. М. В. Ломоносова или собранных коллегами на местах и автором лично (табл. 1). Для разработки метода выявления гибридов европейского благородного и пятнистого оленей в анализ дополнительно включили 10 образцов европейского благородного оленя и 34 образца пятнистого оленя из частного оленеводческого хозяйства в Смоленской области (Ферма 3) и 10 образцов дикого пятнистого оленя из популяции Приморья.

Выделение ДНК проводили с помощью коммерческих наборов по прописям производителя: ДНК из образцов мягких тканей и цельной крови – набор D1Atom™ DNAPrep (Изоген, Россия); ДНК из экскрементов – набор QiaAmp® Fast DNA Stool mini Kit (Qiagen GmbH, Germany); выделение ДНК из музейных образцов – набор QiaAmp® DNA Investigator Kit (Qiagen GmbH, Germany). Определение последовательностей гена цитохрома *b* (*cyt b*) и D-петли мтДНК проводили с помощью секвенирования по Сэнгеру продуктов полимеразной цепной реакции (ПЦР) на автоматических секвенаторах ABI PRISM 3500 и 3130 (Termofisher scientific, USA). Анализ полиморфизма 8-15 аутомных микросателлитных локусов яДНК проводили с помощью флуоресцентно меченых праймеров на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 3130 (Termofisher scientific, США).

**Таблица 1.** Количество образцов из разных локалитетов, включенных в генетический анализ.

Подвид, Локалитет	Общее количество образцов	МтДНК анализ	Микросателлит- ный анализ
<b>Восточный благородный олень:</b>	112	112	112
<b>Марал (<i>C. c. sibiricus</i>):</b>	<b>59</b>	<b>59</b>	<b>59</b>
Ферма 1, Костромская область	24	24	24
Ферма 2, Алтай	24	24	24
Природная популяция	11	11	11
<b>Изюбрь (<i>C. c. xanthopygus</i>), природная популяция</b>	40	40	40
<b>Благородный олень Якутии, природная популяция</b>	13	13	13
<b>Европейский благородный олень</b>	116	100	91
<b>Воронежский олень (<i>C. e. hippelaphus</i>):</b>	<b>43</b>	<b>43</b>	<b>24</b>
Воронежская область	9	9	0
Белгородская область	14	14	8
Липецкая область	20	20	16
<b>Кавказский олень (<i>C. e. maral</i>):</b>	<b>39</b>	<b>31</b>	<b>34</b>
Кавказский заповедник (современные образцы)	6	6	5
Кавказский заповедник (образцы первой половины XX в.).	15	7	15
Природная популяция Северного Кавказа и Закавказья	15	15	14
ГПЗ «Утриш» (возможно, помесь кавказского и воронежского оленей)	3	3	0
<b>Испанский олень (<i>C. e. hispanicus</i>), Испания</b>	24	23	24
<b>Паннонский олень (<i>C. e. pannoniensis</i>), Венгрия</b>	10	3	9
Итого:	<b>228</b>	<b>212</b>	<b>203</b>

Статистическую обработку полученных данных мтДНК анализа проводили с помощью следующих программ: Network v. 10 (Fluxus Technology Ltd, UK) – медианные сети; программная платформа BEAST v. 2.7.5 (Bouckaert et al., 2019) – байесовское дерево; MEGA X (Kumar et al., 2018) – выбор эволюционных моделей, филогенетические деревья по методу максимального

правдоподобия (Maximum Likelihood, ML), генетические р-дистанции; Arlequin v. 3.5 (Excoffier, Lischer, 2010) - коэффициент D теста на нейтральность Таджики, генетическая *Fst* дифференциация, гаплотипическое (*H*) и нуклеотидное ( $\pi$ ) разнообразие.

Статистическую обработку данных микросателлитного анализа проводили с помощью следующих программ: GenAIEx 6.5 (Peakall, Smouse, 2006, 2012) – отклонение от равновесия Харди-Вайнберга, уровень генетической дифференциации (*Fst*), показатели генетического разнообразия (число аллелей на локус (*Na*), число эффективных аллелей (*Ne*), наблюдаемая гетерозиготность (*Ho*), ожидаемая гетерозиготность (*He*), индекс фиксации (*F*), индекс разнообразия Шеннона (*I*)), расчет индивидуальных генетических дистанций и анализ главных координат (PCoA) на их основе; CERVUS 3.0 (Kalinowski et al., 2007) – частоты нуль-аллелей; FSTAT v. 2.9 (Goudet, 1995) – аллельное разнообразие (*AR*); POPTREE2 (Takezaki et al., 2010) – филогенетические деревья на основании *Da* генетических дистанций по Нею, STRUCTURE v. 2.3 (Pritchard et al., 2000) – байесовская кластеризация, оптимальное число кластеров было определено с помощью метода Эванно (Earl, von Holdt, 2012) и по методу Притчарда (Pritchard et al., 2010; Kopelman et al., 2015).

## 2.2. Акустический анализ

Гонные вокализации самцов благородного оленя были собраны с помощью автоматических звукозаписывающих устройств – сонметров Song Meter SM2+ (Wildlife-Acoustics Inc., Concord, MA, USA). Гонные крики самцов марала были записаны в трех локалитетах: природном («Хакасия», ГПЗ «Хакасский», республика Хакасия), полувольном («Тверь», Полубратовское охотничье хозяйство, Тверская область) и фермерском («Кострома», Костромской мараловодческий комплекс, Костромская область, то же, что и «Ферма 2»). Гонные крики самцов изюбря были записаны в трех природных популяциях: в двух популяциях Хабаровского края («Хехцир», ГПЗ «Большехехцирский», и «Анью», НП «Аньюский») и в одной популяции Приморья («Уссурийск», ГПЗ «Уссурийский»). Гонные ревы воронежского благородного оленя были записаны в частном охотничьем хозяйстве в Белгородской области. Гонные ревы кавказского благородного оленя были записаны в ГПЗ «Кавказский».

В анализ вошло 1862 главных гонных крика. Главными были назначены самые длинные в серии (буте) гонные крики. Для восточного благородного оленя было проанализировано 435 гонных криков марала (по 145 из каждого локалитета) и 598 гонных криков изюбря (249 из Уссурийска (202 за гон 2014 и 47 за гон 2015 гг.); 255 из Хехцира и 94 из Анюя). Для европейского благородного оленя было проанализировано 467 бутов воронежского оленя и 362 бута кавказского оленя.

Измерения параметров звуков были проведены в спектрографической программе Avisoft SASLab Pro v. 5.2.07 (Avisoft Bioacoustics, Berlin, Germany). В каждом главном крике восточного благородного оленя мы измеряли 13 акустических переменных: 4 временные, 4 энергетические характеристики и 5 измерений основной частоты (*g0*). В гонных криках марала мы дополнительно измеряли среднюю по звуку основную частоту (*g0 mean*) в программе Praat DSP (Boersma, Weenink, 2013) по методу Reby, McComb (2003). В каждом главном крике обоих подвидов мы также отмечали наличие или отсутствие второй низкой основной частоты *f0* и детерминированного хаоса. Анализ гонных ревов европейского благородного оленя проводили на уровне бутов и на уровне главного рева. Для каждого бута измеряли число ревов в буте и определяли самый высокочастотный рев. Главные ревы были классифицированы в соответствии с их акустической структурой на два типа: обычные ревы (до 50% длительности хаоса и субгармоник) и шумовые ревы (от 50 до 100% хаоса и субгармоник) (Frey et al., 2012). Для главного рева мы также отмечали его положение (в начале, середине или конце бута), а также максимальную основную частоту (*f0max*) и длительность.

Статистическая обработка была проведена в программе STATISTICA, v. 8.0 (Statsoft, Inc., Tulsa, OK, USA). Сравнение процентных соотношений проводили с помощью критерия  $\chi^2$  с поправкой Йейтса (Yates corrected  $\chi^2$ ). Влияние различных факторов на структуру гонных вокализаций в нескольких выборках оценивали с помощью дисперсионного анализа с пост-хок тестом Тьюкей (Tukey post hoc test) или пост-хок тестом Тьюкей для неравных выборок (Unequal N post hoc test). Для парных сравнений мы использовали двухвыборочный t-критерий Стьюдента для независимых переменных.

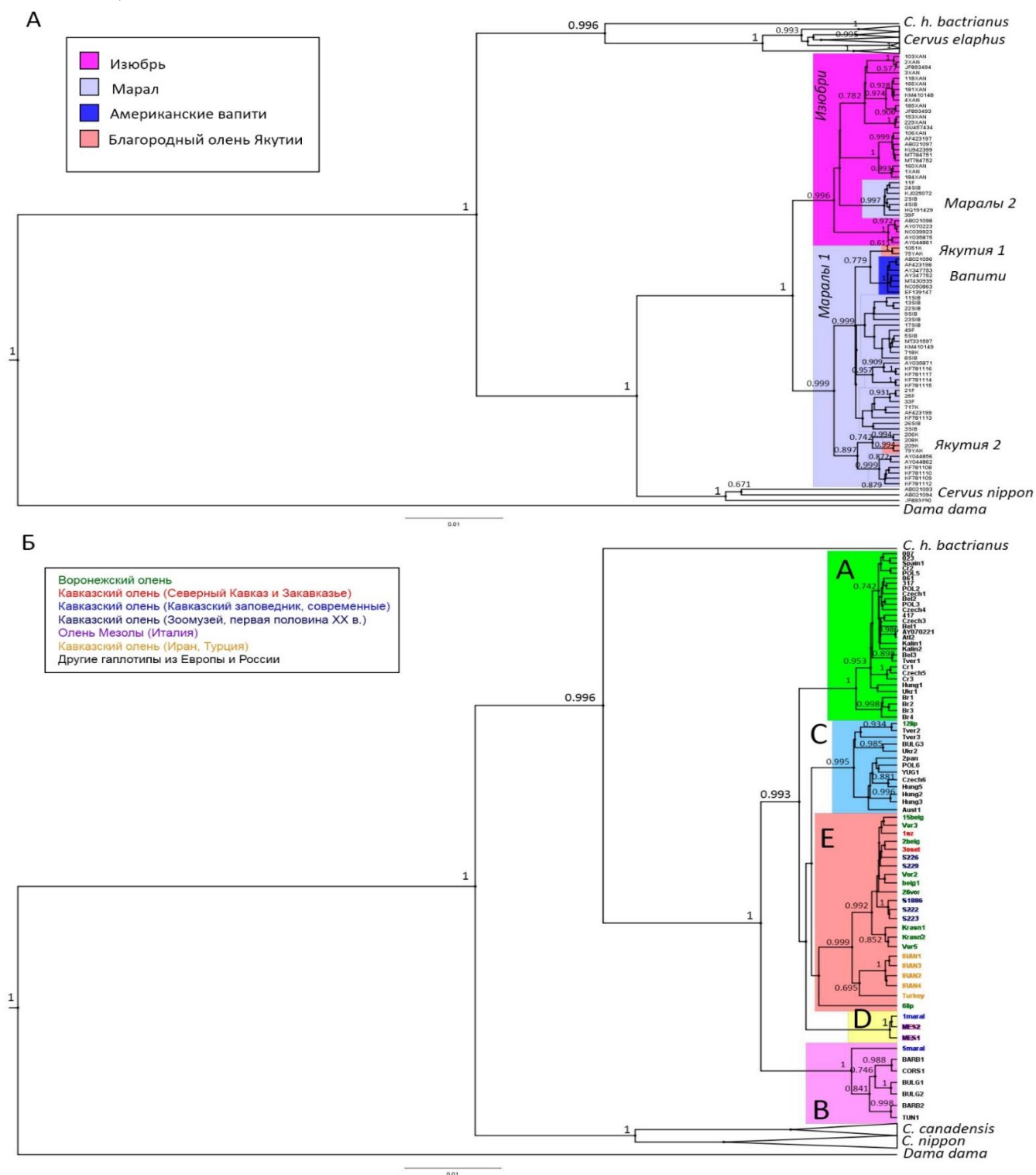


## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

### 3.1. Генетическая структура благородного оленя *C. elaphus s. l.* России

#### Общая характеристика генетической структуры благородного оленя *C. elaphus s. l.* России

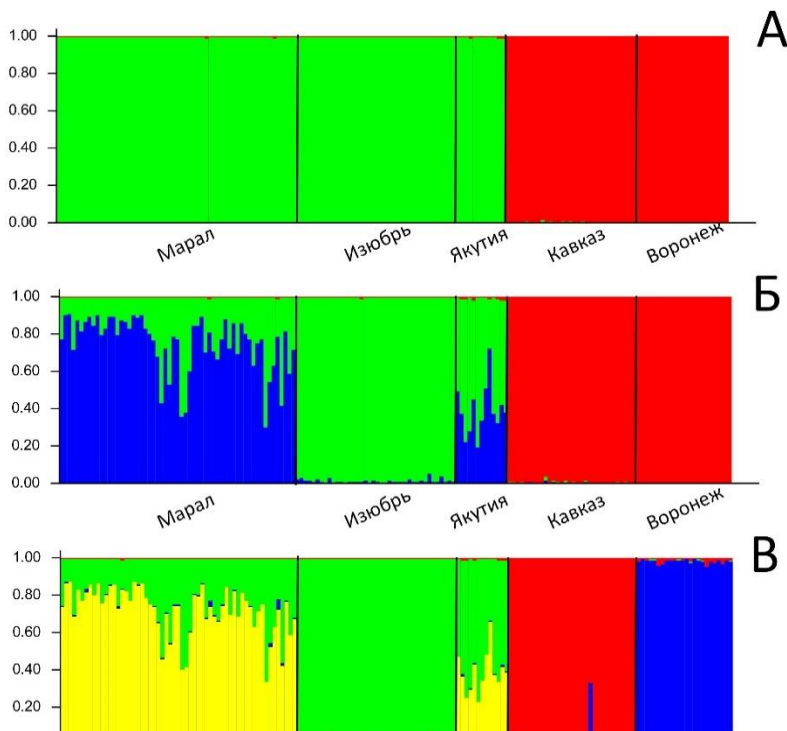
На основании 159 мтДНК гаплотипов из данного исследования и базы данных Генбанк (GenBank NCBI) было построено дерево методом байесовской реконструкции (рис. 1А,Б). В качестве внешней группы мы выбрали гаплотип европейской лани *Dama dama* (номер в Генбанке MN746794).



**Рисунок 1.** Филогенетическое дерево *cyt b* гаплотипов (1104 п.н.) **А** – подробно для восточного благородного оленя, **Б** – подробно для европейского благородного оленя, построенное на основании 159 последовательностей методом байесовской реконструкции с помощью программы BEAST с применением модели НКУ+G. В узлах указаны достоверные (>50%) значения поддержки.

Кластер европейского благородного оленя занял внешнее положение по отношению к «восточному» кластеру, включившему в себя клады пятнистого и восточного благородного оленей. Центральноазиатский благородный олень *C. hanglu bactrianus* (AY142327) оказался ближе к европейскому благородному оленю (рис. 1А,Б). Генетическая *p*-дистанция между выборками восточного и европейского благородных оленей составила  $0.054 \pm 0.006$ .

Фрагментный анализ общей выборки благородного оленя России был проведен по 11 аутосомным микросателлитным локусам яДНК. При кластеризации выборки с использованием байесовских алгоритмов в программе STRUCTURE при количестве кластеров (*K*), равном двум, генотипы восточного благородного оленя отделились от генотипов европейского благородного оленя (рис. 2А). При *K* = 3 выборка восточного благородного оленя образовала два кластера:



А «марал» и «изюбрь», где кластер марала был более гетерогенным. Выборка из Якутии включала в себя смешанные гаплотипы. Кластер европейского благородного оленя остался гомогенным (рис. 2Б). При оптимальном *K* = 4, выявленном с помощью метода Эванно, общая выборка образовала кластеры, соответствующие подвидовой принадлежности (рис. 2В). При этом генотип 144к из Карачаево-Черкессии нес смешанные черты «воронежского» и «кавказского» кластеров.

В Генетическая *F<sub>st</sub>* дифференциация между выборками восточного благородного оленя была выражена гораздо слабее, чем между выборками европейского благородного оленя (табл. 2). Уровень дифференциации между общими выборками восточного и европейского благородных оленей составила 0.087.

**Рисунок 2.** Кластеризация выборки благородного оленя России, где А – для *K*=2, Б – для *K*=3, В – для *K*=4. По оси абсцисс – генотипы, по оси ординат – вероятность принадлежности к одному из кластеров. Применена модель генетического смешения (admixture) со скоррелированными частотами аллелей в популяциях. Обозначения: Якутия - благородный олень из Якутии, Кавказ – кавказский благородный олень, Воронеж – воронежский благородный олень.

**Таблица 2.** Генетическая *F<sub>st</sub>* дифференциация между выборками благородного оленя России, основанная на анализе 11 микросателлитных локусов. Для всех значений  $p \leq 0.001$ .

	Марал	Изыюбрь	Благородный олень из Якутии	Кавказский олень
Изыюбрь	0.040			
Благородный олень из Якутии	0.044	0.050		
Кавказский олень	0.075	0.102	0.089	
Воронежский олень	0.158	0.198	0.194	0.101

В общей выборке было обнаружено 49 частных (характерных только для определенной выборки или популяции) аллелей. Больше всего частных аллелей (20) было отмечено для выборки кавказского оленя. В выборке воронежского оленя было отмечено всего 5 частных аллелей. Для марала количество частных аллелей было равно 9, для изюбря – 11, для благородного оленя из Якутии – 4. Из 156 аллелей 66 встречались только в генотипах восточного благородного оленя, 35 – только в генотипах европейского благородного оленя.

Большинство показателей генетического разнообразия оказались выше в выборках восточного благородного оленя (марал и изюбрь), чем в выборках европейского благородного оленя (табл. 3). Однако, ожидаемая ( $H_e$ ) и наблюдаемая ( $H_o$ ) гетерозиготность, а также число частных аллелей оказались выше в выборке современного кавказского оленя. Воронежский олень имел самые низкие значения показателей генетического разнообразия. Для выборки марала и благородного оленя из Якутии отмечены относительно высокие значения индекса фиксации.

**Таблица 3.** Показатели генетического разнообразия (среднее  $\pm$  SE) благородного оленя России на основании анализа полиморфизма 11 микросателлитных локусов яДНК. Обозначения:  $N$  – число образцов,  $N_a$  – число аллелей на локус,  $H_o$  – наблюдаемая гетерозиготность,  $H_e$  – ожидаемая гетерозиготность,  $F$  – индекс фиксации,  $A_R$  – аллельное разнообразие.

Выборка	N	$N_a$	$H_o$	$H_e$	F	N частных аллелей	$A_R$
Марал	59	$8.909 \pm 1.404$	$0.564 \pm 0.089$	$0.621 \pm 0.085$	$0.093 \pm 0.060$	$0.818 \pm 0.263$	6.012
Изюбрь	40	$8.545 \pm 1.171$	$0.608 \pm 0.081$	$0.634 \pm 0.084$	$0.037 \pm 0.020$	$1.000 \pm 0.357$	6.255
Благородный олень из Якутии	13	$4.909 \pm 0.836$	$0.527 \pm 0.090$	$0.584 \pm 0.078$	$0.096 \pm 0.081$	$0.364 \pm 0.203$	4.830
Кавказский олень	18	$6.182 \pm 0.644$	$0.632 \pm 0.072$	$0.641 \pm 0.059$	$0.013 \pm 0.060$	$1.818 \pm 0.296$	5.546
Воронежский олень	24	$4.091 \pm 0.392$	$0.477 \pm 0.067$	$0.488 \pm 0.056$	$0.024 \pm 0.056$	$0.455 \pm 0.207$	5.117

#### Характеристика подвидов восточного благородного оленя, марала *C. c. sibiricus* и изюбря *C. c. xanthopygus*, по данным полиморфизма мтДНК и микросателлитных локусов яДНК

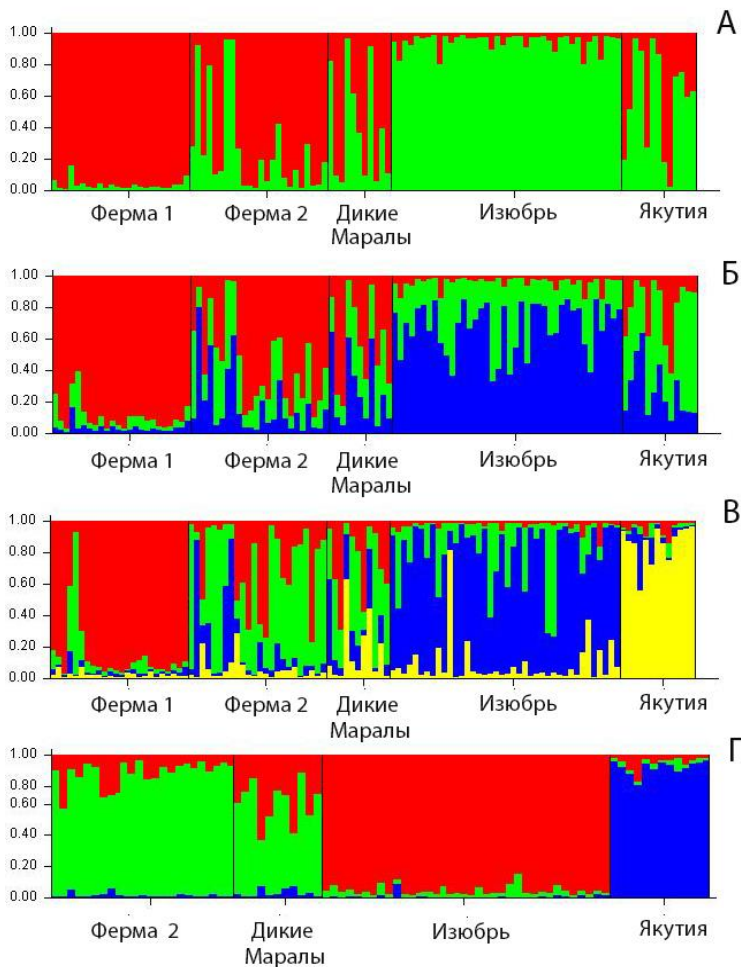
Филогенетический анализ выборки восточного благородного оленя показал разделение на два кластера с высокой поддержкой: в один из них вошли все гаплотипы изюбря и китайских подвидов *C. c. kansuensis*, *C. c. macneilli* и *C. c. wallichii*, в другой – большинство гаплотипов марала, американских вапити и благородных оленей из Якутии (рис. 1А). Часть гаплотипов марала (алтайского *C. c. sibiricus* и семиреченского *C. c. songaricus*) вошла в один кластер с изюбром, образовав обособленную кладу (группа «Маралы 2»). Последовательности редкого подвида *C. c. alashanicus* (распространенного в Монголии и северном Китае) несли идентичный изюбрю гаплотип 106ХАН. Выборка благородного оленя из Якутии оказалась неоднородна: обособленная от других гаплотипов из России группа «Якутия 1» была родственна североамериканским гаплотипам, а гаплотипы из группы «Якутия 2» образовали отдельную кладу, родственную маралу (рис. 1А). Семиреченский марал *C. c. songaricus* нес близкие или идентичные алтайскому маралу *C. c. sibiricus* гаплотипы.

Генетическая  $F_{st}$  дистанция была наименьшей между выборками марала и изюбря ( $F_{st} = 0.123$ ). По уровню  $F_{st}$  дифференциации выборка благородного оленя из Якутии была ближе к выборке марала ( $F_{st} = 0.199$ ), чем к выборке изюбря ( $F_{st} = 0.207$ ).

Показатели генетического разнообразия были самыми низкими в выборке благородного оленя из Якутии, хотя уровень нуклеотидного разнообразия ( $\pi$ ) в выборке оленя из Якутии был таким же, как в выборке изюбря (табл. 4).

**Таблица 4.** Показатели генетического разнообразия (среднее  $\pm$  SD) восточного благородного оленя России на основании мтДНК анализа. Обозначения:  $N$  – число образцов,  $h$  – гаплотипическое разнообразие,  $\pi$  – нуклеотидное разнообразие, PD – среднее число попарных различий.

Выборка	N	N гаплотипов	N полиморфных сайтов	$h$	$\pi$	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%)	$0.877 \pm 0.029$	$0.005 \pm 0.003$	$6.031 \pm 2.934$
Благородный олень из Якутии	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%)	$0.946 \pm 0.001$	$0.010 \pm 0.005$	$10.804 \pm 4.953$



**Рисунок 3.** Кластеризация выборки восточного благородного оленя: 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. Обозначения: Ферма 1 – маралы с Фермы 1 (Костромской мараловодческой комплекс), Ферма 2 – маралы с Фермы 2 (ОПХ «Новоталицкое»), Якутия – благородный олень из Якутии

оленя из Якутии имела промежуточное значение ( $F_{st} = 0.047, p \leq 0.001$ ).

### Характеристика европейского благородного оленя России *C. elaphus* по данным полиморфизма мтДНК и микросателлитных локусов яДНК

Филогенетический анализ выборки европейского благородного оленя с привлечением данных из Генбанка показал разделение на пять описанных ранее гаплогрупп А-Е с высокой апостериорной вероятностью (рис. 1Б). Гаплогруппа А объединила гаплотипы из Центральной и Западной Европы. Гаплогруппу В образовали гаплотипы из Северной Африки, Корсики и Сардинии вместе с гаплотипом из Кавказского заповедника 5MARAL. Гаплогруппа С включала гаплотипы из Центральной и Восточной Европы, а также гаплотип воронежского оленя 12LIP. Гаплогруппа D была образована гаплотипом, найденным у современных благородных оленей из Кавказского заповедника, Карачаево-Черкессии и Северной Осетии (1MARAL), и гаплотипами оленя Мезолы *C. e. italicus*. Гаплогруппа Е включала гаплотипы из России (рис. 1Б). Гаплогруппа С являлась внешней по отношению к сестринским кладам D и E (рис. 1Б).

На медианной сети гаплотипов показано, что гаплогруппа Е была образована гаплотипами

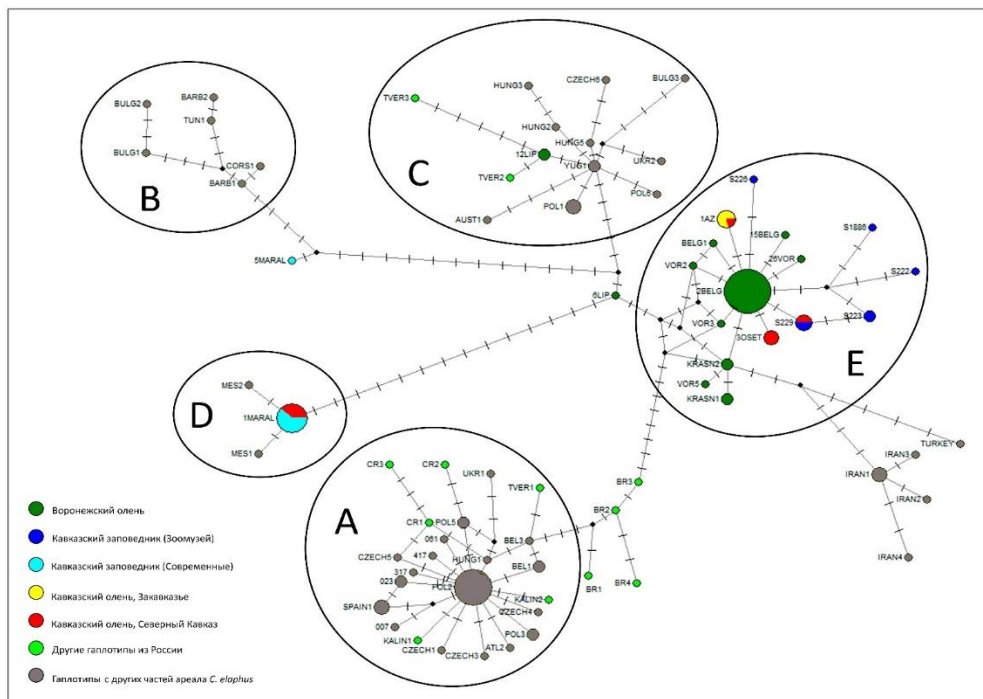
Выборка образцов марала имела самые высокие показатели генетического разнообразия, хотя показатель гаплотипического разнообразия ( $H$ ) был таким же, как в выборке изюбря.

Для всей исходной выборки восточного благородного оленя был проведен анализ по 12 микросателлитным локусам яДНК (табл. 1). Кластерный анализ в программе STRUCTURE и последующим применением метода Эванно показал наиболее вероятное разделение выборки на два кластера ( $K = 2$ , рис. 3А). Однако мы отметили ярко выраженную гомогенность выборки марала с Фермы 1 (рис 3А-В). Учитывая небольшую численность маралов в хозяйстве и фиксированное количество самцов, допущенных к размножению, можно предположить, что в данном локалитете закрепились редкие аллели, влияющие на кластеризацию. Для исключения возможности подобного влияния мы провели анализ для четырех оставшихся выборок отдельно (рис. 3Г). В результате было выделено три кластера ( $K=3$ ), два из которых (кластер изюбря и кластер благородного оленя из Якутии) обладали высокой степенью гомогенности. На кластер марала отмечено влияние генотипов изюбря (рис. 3Г).

Генетическая  $F_{st}$  дифференциация оказалась довольно слабо выраженной. Различия по  $F_{st}$  были максимальными между выборками изюбря и благородного оленя из Якутии ( $F_{st} = 0.051, p \leq 0.001$ ) и минимальными между выборками изюбря и марала ( $F_{st} = 0.037, p \leq 0.001$ ). Дистанция между выборками марала и благородного оленя из Якутии имела промежуточное значение ( $F_{st} = 0.047, p \leq 0.001$ ).



воронежского оленя и современными гаплотипами кавказского оленя из Адыгеи, Дагестана, Северной Осетии и Азербайджана (рис. 4). Кроме того, в нее вошли гаплотипы из Кавказского заповедника первой половины XX в. Гаплотипы из Турции и Ирана заняли на сети обособленное положение, близкое к группе E. Для гаплогруппы E была видна характерная звездообразная структура с центральным гаплотипом воронежского оленя 2BELG, найденным у благородных оленей Воронежской, Белгородской, Липецкой областей и Краснодарского края (рис. 4).



**Рисунок 4.** Медианная сеть гаплотипов европейского благородного оленя на основании 154 последовательностей длинного фрагмента гена цитохрома *b* (1104 п. н.). Черточки обозначают мутации, размер кружков пропорционален частоте гаплотипов, но длина ветвей не пропорциональна генетическим дистанциям.

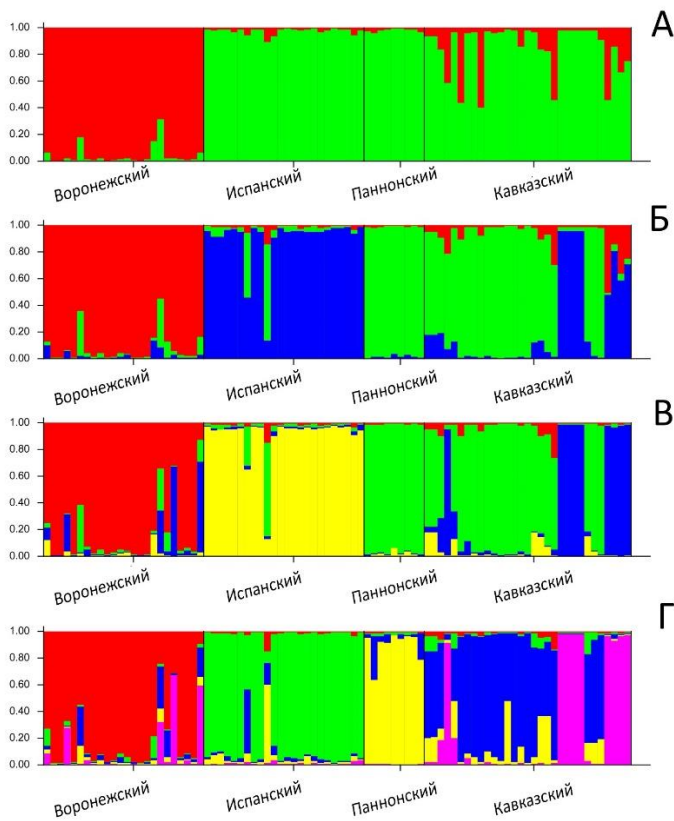
Уровень *Fst* дифференциации между выборками воронежского оленя (гаплогруппа E) и кавказского оленя из гаплогруппы D оказался достаточно высок и был равен 0.874. Уровень дифференциации между выборками современного кавказского оленя из гаплогруппы E и воронежского оленя был ожидаемо низок и составил 0.162.

Показатели генетического разнообразия европейского благородного оленя России имели невысокие значения (табл. 5). Показатель гаплотипического разнообразия ( $h$ ) был самым низким в выборке кавказского оленя из гаплогруппы D, при этом показатель нуклеотидного разнообразия ( $\pi$ ) был в этой выборке самым высоким. Напротив, выборка современного кавказского оленя из гаплогруппы E демонстрировала самое высокое значение  $h$  при самом низком значении  $\pi$ . Выборка воронежского оленя имела промежуточные значения данных показателей (табл. 5). Следует отметить, что небольшой размер выборок кавказского оленя не позволяет нам однозначно судить о генетическом состоянии его популяций.

**Таблица 5.** Показатели генетического разнообразия (среднее  $\pm$  SD) европейского благородного оленя России на основании мтДНК анализа. Обозначения: *N* – число образцов,  $h$  – гаплотипическое разнообразие,  $\pi$  – нуклеотидное разнообразие, PD – среднее число попарных различий.

Выборка	<i>N</i>	<i>N</i> гаплотипов	<i>N</i> полиморфных сайтов	$h$	$\pi$	PD
Кавказский олень D	14	2	26 (2.4%)	0.143 $\pm$ 0.119	0.003 $\pm$ 0.002	3.714 $\pm$ 1.995
Кавказский олень E	10	3	3 (0.3%)	0.689 $\pm$ 0.104	0.001 $\pm$ 0.001	1.378 $\pm$ 0.924
Воронежский олень	43	11	17 (1.5%)	0.515 $\pm$ 0.093	0.002 $\pm$ 0.001	1.920 $\pm$ 1.114
В целом	67	16	45 (4.1%)	0.760 $\pm$ 0.046	0.007 $\pm$ 0.004	7.778 $\pm$ 3.668

Микросателлитный анализ по 8 микросателлитным локусам был проведен для 88 образцов европейского благородного оленя из России и Европы (Испании и Венгрии, табл. 1).



**Рисунок 5.** Кластеризация выборки европейского благородного оленя, при А –  $K=2$ , Б –  $K=3$ , В –  $K=4$ ; Г –  $K=5$ . По оси абсцисс – генотипы, по оси ординат – вероятность принадлежности к одному из кластеров. Применена модель генетического смешения (admixture) без учета географического происхождения образцов (без LOCPRIOR) со скоррелированными частотами аллелей в популяциях.

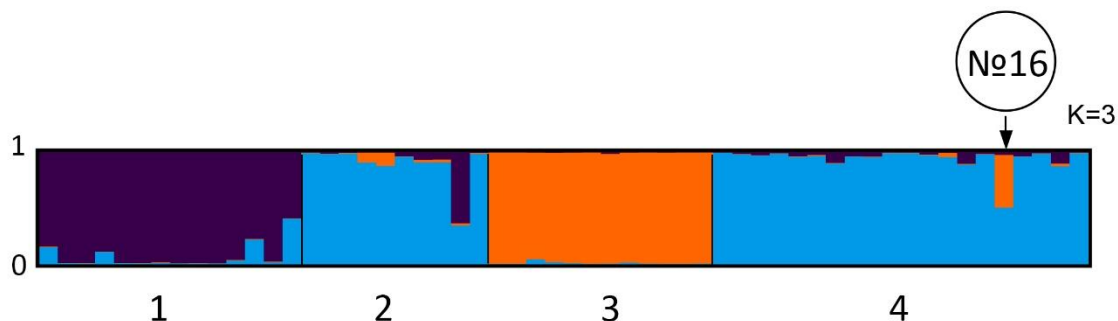
оленя и благородных оленей из европейских популяций.

### **Выявление потенциальной гибридизации европейского благородного и пятнистого оленей и определение подвидовой принадлежности особей европейского благородного оленя неизвестного происхождения**

Оценка происхождения и выявление следов гибридизации были проведены нами для 34 образцов фенотипически пятнистого оленя и 10 образцов фенотипически европейского благородного оленя из частного охотничьего хозяйства в Смоленской области («Ферма 3»). В качестве образцов с известным видовым статусом мы включили в анализ 10 образцов уссурийского пятнистого оленя *S. n. hortulorum* из природной популяции Дальнего Востока. Вначале мы определяли видовую и подвидовую принадлежность животных по мтДНК маркерам – *cyt b* и D-петле, после чего с помощью микросателлитного анализа выявляли следы гибридизации. В результате была обнаружена одна гибридная особь (№16), несущая мтДНК пятнистого оленя и по 50% микросателлитных аллелей, характерных для европейского благородного и пятнистого оленей (рис. 6).

Кластеризация с помощью алгоритма STRUCTURE не показала разделение выборки кавказского оленя на линии D и E (рис. 5А-Г). При  $K=2$  выборка воронежского оленя образовала отдельный гомогенный кластер, который сохранил свою обособленность от других выборок европейского благородного оленя и при больших значениях  $K$ . При оптимальном  $K=3$  была отмечена гетерогенность выборки кавказского оленя: часть генотипов принадлежала к тому же кластеру, что и генотипы паннонского оленя *S. e. pannoniensis* из Венгрии (все современные и исторические генотипы из Кавказского заповедника, генотипы из Карачаево-Черкессии, Адыгеи и Дагестана, часть генотипов из Северной Осетии), часть – к тому же кластеру, что и генотипы испанского оленя (генотипы из Азербайджана, некоторые генотипы из Северной Осетии) (рис. 5Б).

По уровню  $F_{st}$  дифференциации выборка воронежского оленя сильнее отличалась от европейских популяций, чем выборка кавказского оленя, хотя в целом уровень дифференциации был невысоким ( $0.048 < F_{st} < 0.150$ ). Различия между выборками кавказского и воронежского оленей по данному показателю были выражены сильнее, чем между выборками кавказского

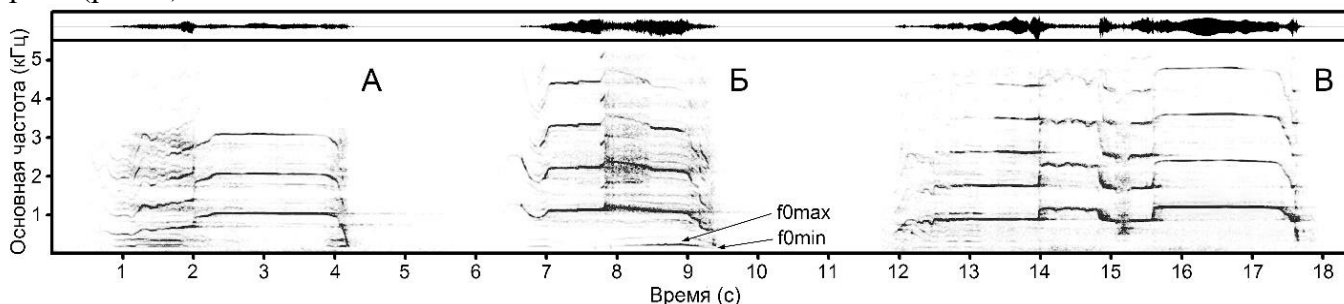


**Рисунок 6.** Выявление следов гибридизации в выборках пятнистого и европейского благородного оленей для  $K = 3$ . По оси абсцисс – генотипы, по оси ординат – вероятность принадлежности к одному из кластеров. Цифры соответствуют выборкам: 1, 4 – пятнистый олень с Фермы 3; 2 – пятнистый олень из природной популяции Дальнего Востока; 3 – европейский благородный олень. Применена модель генетического смешения (admixture) со скоррелированными частотами аллелей в популяциях.

### 3.2. Акустический анализ гонных вокализаций самцов благородного оленя *C. elaphus s. l. России*

#### Структурные особенности гонных криков восточного благородного оленя, марала *C. c. sibiricus* и изюбря *C. c. xanthopygus*

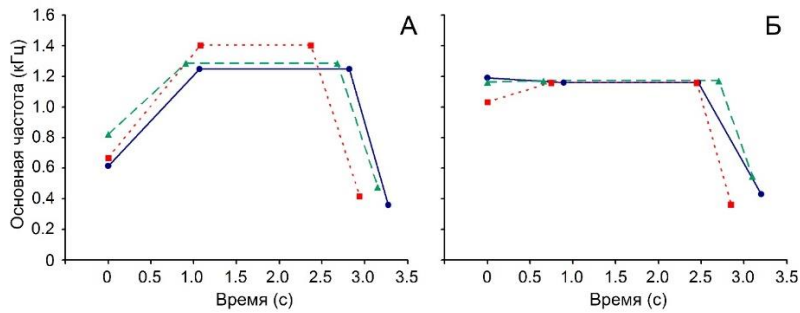
Все гонные крики восточного благородного оленя имели выраженную частотную модуляцию и пролонгированное плато контура основной частоты, как правило, в области максимальной основной частоты. На основании контура основной частоты все гонные крики восточного благородного оленя были классифицированы на три паттерна: самый распространенный трапецевидный, имевший хорошо выраженные подъем основной частоты в начале и ее понижение в конце крика, понижающийся, не имевший начального подъема основной частоты, и самый редкий седлообразный, характеризовавшийся наличием резкого понижения основной частоты в середине крика (рис. 7).



**Рисунок 7.** Паттерны гонных криков марала на спектрограмме (зависимости основной частоты  $g0$  от времени): А – трапецевидный, Б – понижающийся, В – седлообразный. Максимальное значение второй (низкой) основной частоты отмечено на рисунке как  $f0max$ , минимальное значение второй основной частоты отмечено как  $f0min$ .

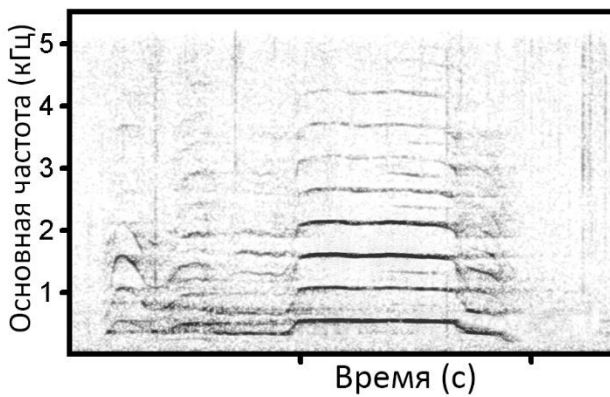
Из 435 гонных криков марала 355 криков (81.6%) были одиночными, остальные 80 (18.4%) издавались вместе с серией коротких докриков. Все крики были высокочастотными: максимальная основная частота варьировала от 0.52 до 2.56 кГц (в среднем  $1.36 \pm 0.29$  кГц), минимальная основная частота варьировала от 0.12 до 0.99 кГц (в среднем  $0.41 \pm 0.18$  кГц). Длительность криков варьировала от 0.83 до 5.95 с и в среднем составляла  $3.12 \pm 0.70$  с. Вторая низкая основная частота была отмечена в 331 (76.1%) криках, детерминированный хаос – в 73 (16.8%) криках марала. В среднем, минимальное значение второй (низкой) основной частоты составило  $182.3 \pm 82.4$  Гц, максимальное –  $207.1 \pm 95.6$  Гц.

Двухфакторный дисперсионный анализ, проведенный для гонных криков марала из трех локалитетов с разными условиями обитания, установил достоверное влияние локалитета на 13 акустических параметров из 14. Паттерн основной частоты влиял только на 6 параметров из 14. Крики с трапецевидным паттерном из Костромы (фермерский локалитет) обладали достоверно более высоким и коротким плато, чем крики из Твери (полувольтный локалитет) и Хакасии (природный локалитет) (рис. 8А,Б).



**Рисунок 8.** Межпопуляционные различия контуров основной частоты ( $g0$ ) в криках марала с трапецевидным (А) и понижающимся (Б) паттернами. Красным отмечен контур основной частоты криков маралов из Костромы, зеленым – из Твери, синим - из Хакасии.

Из 598 гонных криков изюбря 476 криков (79.6%) были одиночными, остальные 122 (20.4%) состояли из длинного главного крика и нескольких коротких докриков (1-7). Среднее количество криков на бут составило  $1.3 \pm 0.6$ . Длительность главного крика составляла от 1.34 до 6.43 с (в среднем  $3.35 \pm 0.76$  с) (рис. 9). Максимальная основная частота составляла от 190 до 1190 Гц (в среднем  $627 \pm 156$  Гц); минимальная – от 70 до 441 Гц (в среднем  $200 \pm 57$  Гц). В 164 криках (27.4%) присутствовала вторая низкая основная частота (от 52 до 220 Гц), в 26.8% криков были отмечены фрагменты детерминированного хаоса. В среднем, минимальное значение второй основной частоты составило  $101.9 \pm 27.4$  Гц, максимальное –  $118.5 \pm 28.0$  Гц.

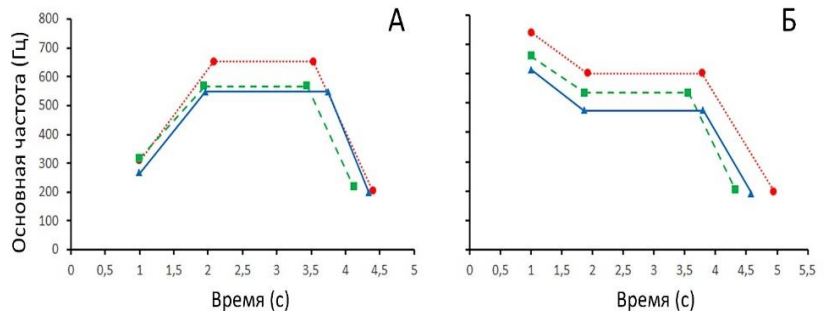


**Рисунок 9.** Спектрограмма трапецевидного гонного крика изюбря.

Двухфакторный дисперсионный анализ, проведенный для гонных криков изюбря из трех природных популяций, установил достоверное влияние фактора популяции на 9 акустических параметров из 13. Паттерн основной частоты влиял на 6 параметров из 13. По большинству акустических параметров популяция Приморья (Уссурийск) отличалась от популяций Хабаровского края (Хехцира и Анюя). Различия между двумя популяциями Хабаровского края были выражены слабее. Сравнение контуров основной частоты показало высокую основную частоту и большую длительность криков из популяции Уссурийска обоих паттернов (рис. 10А,Б).

Трапецевидные крики из популяции Уссурийска были более длинными, но имели более короткое плато, чем трапецевидные крики из популяций Хабаровского края. (рис. 10А).

**Рисунок 10.** Межпопуляционные различия контуров основной частоты ( $g0$ ) в криках изюбря с трапецевидным (А) и понижающимся (Б) паттернами. Красным отмечен контур основной частоты криков изюбря из Уссурийска, зеленым – из Хехцира, синим - из Анюя.

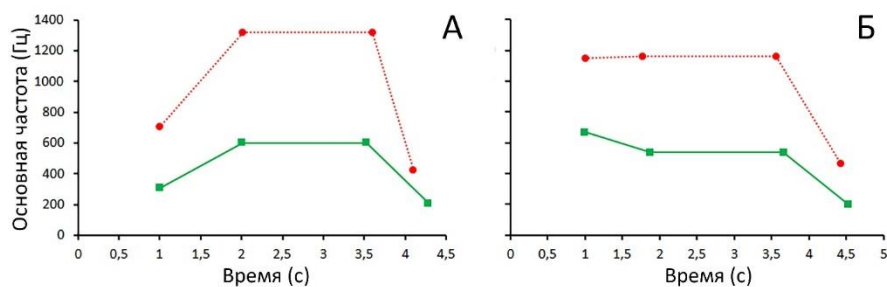


Марал и изюбрь отличались по процентному соотношению гонных криков с разными паттернами основной частоты. Трапецевидный паттерн был самым распространенным как для марала, так и для изюбря, однако марал издавал крики с трапецевидным паттерном реже, чем изюбрь ( $\chi^2=10.13$ ,  $df=1$ ,  $p=0.002$ ) и чаще издавал крики с понижающимся паттерном ( $\chi^2=16.34$ ,  $df=1$ ,  $p<0.001$ ). Крики марала реже содержали детерминированный хаос ( $\chi^2=13.78$ ,  $df=1$ ,  $p<0.001$ ). В криках марала гораздо чаще присутствовала вторая (низкая) основная частота  $f0$  ( $\chi^2=237.04$ ,  $df=1$ ,  $p<0.001$ ). И марал, и изюбрь издавали, в основном, одиночные крики, различий по соотношению одиночных и издаваемых в составе бутов криков выявлено не было.

Сравнение влияния факторов «подвид» и «паттерн» ожидаемо показало более выраженное влияние подвидовой принадлежности на акустические параметры гонных криков восточного



благородного оленя. Фактор подвида сильно влиял на большинство (11 из 13) параметров, фактор паттерна основной частоты достоверно влиял на 8 из 13 акустических параметров. Гонные крики марала имели более высокую основную частоту, но при этом меньшую длительность (рис. 11).



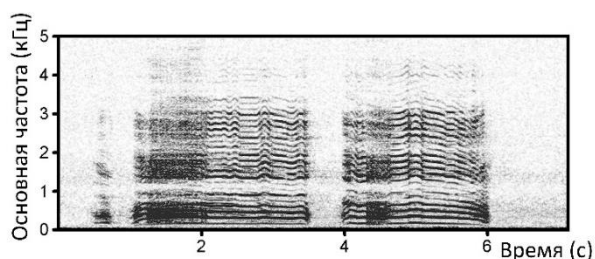
**Рисунок 11.** Различия контуров основной частоты ( $g0$ ) восточного благородного оленя в криках с трапециевидным (А) и понижающимся (Б) паттернами. Красным отмечен контур основной частоты криков марала, зеленым – изюбря.

### Структурные особенности гонных ревов европейского благородного оленя России

Основные акустические параметры гонных ревов воронежского *S. e. hippelaphus* и кавказского *S. e. maral* благородных оленей представлены в табл. 6.

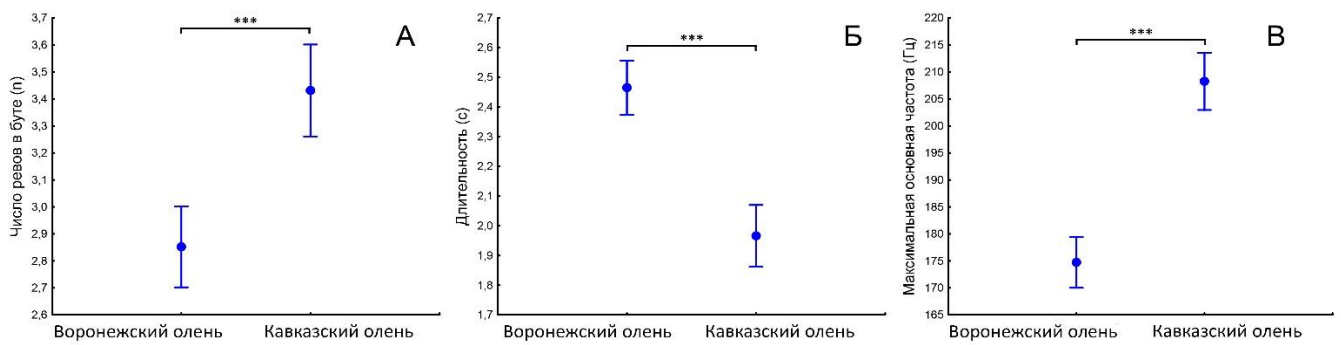
**Таблица 6.** Акустические параметры (среднее  $\pm$  SD) главных гонных ревов европейского благородного оленя России и результаты их сравнения с помощью однофакторного дисперсионного анализа и критерия  $\chi^2$  с поправкой Йэйтса.

Акустический параметр	Воронежский олень	Кавказский олень	ANOVA, $\chi^2$
<b>Все главные ревы</b>			
Ревов в буте ( $n$ )	2.85 $\pm$ 1.79	3.43 $\pm$ 1.45	$F_{1,827}=25.04, p<0.001$
Длительность (с)	2.46 $\pm$ 1.14	1.97 $\pm$ 0.81	$F_{1,827}=49.84, p<0.001$
$f0_{max}$ (Гц)	174.72 $\pm$ 60.44	208.24 $\pm$ 36.51	$F_{1,827}=86.48, p<0.001$
Обычные главные ревы	83.3%	78.2%	$\chi^2=3.16, df=1, p=0.08$
Ревов в буте ( $n$ )	2.85 $\pm$ 1.81	3.35 $\pm$ 1.38	$F_{1,670}=15.26, p<0.001$
Длительность (с)	2.61 $\pm$ 1.16	1.92 $\pm$ 0.85	$F_{1,670}=72.17, p<0.001$
$f0_{max}$ (Гц)	173.06 $\pm$ 57.48	207.62 $\pm$ 37.47	$F_{1,670}=78.13, p<0.001$
Шумовые главные ревы	16.7%	21.8%	$\chi^2=3.16, df=1, p=0.08$
Ревов в буте ( $n$ )	2.79 $\pm$ 1.71	3.71 $\pm$ 1.64	$F_{1,155}=10.18, p<0.01$
Длительность (с)	1.75 $\pm$ 0.67	2.14 $\pm$ 0.63	$F_{1,155}=14.16, p<0.001$
$f0_{max}$ (Гц)	183.92 $\pm$ 74.62	210.47 $\pm$ 32.98	$F_{1,155}=8.20, p<0.01$
Главный рев – наиболее высокочастотный	56.3%	62.2%	$\chi^2=2.63, df=1, p=0.11$
Длительность (с)	2.57 $\pm$ 1.27	2.13 $\pm$ 0.85	$F_{1,486}=19.81, p<0.001$
$f0_{max}$ (Гц)	191.64 $\pm$ 66.59	217.20 $\pm$ 37.77	$F_{1,486}=25.96, p<0.001$
Доля одиночных ревов	21.8%	3.9%	$\chi^2=49.68, df=1, p<0.001$
<b>Позиция главного рева (для бутов 2 и более ревов)</b>			
Первый	26.6%	23.0%	$\chi^2=1.04, df=1, p=0.31$
Промежуточный	27.6%	26.7%	$\chi^2=0.04, df=1, p=0.85$
Последний	45.8%	50.3%	$\chi^2=1.27, df=1, p=0.26$



**Рисунок 12.** Бут кавказского благородного оленя *S. e. maral* из трех ревов.

Однофакторный дисперсионный анализ выявил достоверные различия в значениях всех трех основных параметров (количества ревов в буте, длительности главного рева и его максимальной основной частоты) между выборками воронежского и кавказского оленей (табл. 6). Буты кавказского оленя состояли из большего количества ревов ( $p<0.001$ , Тьюкей пост-хок тест), главные ревы были короче ( $p<0.001$ ) и имели более высокую основную частоту ( $p<0.001$ ) (табл. 6, рис. 12, 13).



**Рисунок 13.** Сравнение акустических параметров главных гонных ревов воронежского и кавказского благородных оленей. А – число ревов в буге, Б – длительность, В – максимальная основная частота. Круги соответствуют средним значениям, усы - 95% доверительного интервала. \*\*\* -  $p < 0.001$ , Тьюкей пост-хок тест.

## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

### 4.1. Филогеографическая структура благородного оленя *Cervus elaphus s. l.* России Филогенетические отношения внутри видового комплекса

Топология построенных нами филогенетических деревьев поддерживает современные представления о разделении *C. elaphus s. l.* на два вида *C. elaphus* и *C. canadensis* в ходе эволюции видового комплекса (Meiri et al., 2018; Doan et al., 2018, 2021; Mackiewicz et al., 2022). Мы не нашли общих гаплотипов для восточного и европейского благородных оленей ни по нашим данным, ни при включении в анализ данных из Генбанка. Генетическая  $p$ -дистанция между выборками восточного и европейского благородных оленей (5.4%) больше, чем, например, между выборками европейской (*Capreolus capreolus*) и сибирской (*C. pygargus*) косуль (3.4–4.3%), которые, как и благородные олени, являются двумя филогенетически близкими видами, способными к межвидовой гибридизации (Кашинина и др., 2018). Результаты микросателлитного анализа также поддержали ярко выраженное разделение на два вида и совершенно разное распределение частот аллелей при большом количестве частных аллелей для восточного и европейского благородных оленей. Различия в акустике двух этих видов поддерживают разделение (что выражается не только в статистически значимых различиях между частотно-временными параметрами гонных вокализаций, но также и в их структуре) (Никольский и др., 1979; Frey, Riede, 2013). Именно поэтому в дальнейшем мы будем рассматривать как генетические, так и акустические особенности двух этих видов отдельно.

#### Филогеографическая структура восточного благородного оленя России

Митохондриальный анализ по гену *cyt b* выявил генетическую неоднородность, свойственную маралу (рис. 1А). Большинство маралов из России (Алтай, Красноярский край и Иркутская область) формируют отдельный большой кластер вместе с маралами из Китая и Монголии, благородными оленями из Якутии и американскими вапиту. Этот кластер соответствует кластеру E3, объединившему гаплотипы, широко распространенные на территории Евразии до Последнего ледникового максимума (Last Glacial Maximum, LGM) (Doan et al., 2018, 2021). Однако мы также нашли некоторые гаплотипы алтайского марала («Маралы 2»), которые вошли в один кластер с гаплотипами изюбря и восточного благородного оленя из Китая. Подобное положение клады «Маралы 2» может свидетельствовать как о следах предкового полиморфизма, так и о митохондриальной интрогрессии (Avise, 2000). Так как именно регион Алтай/Саяны, скорее всего, является центром распространения для вапитоидов, а примитивные морфологические черты изюбрей вторичны и не свидетельствуют об их древности (Meiri et al., 2018), более вероятным выглядит сценарий митохондриальной интрогрессии. Однако для подтверждения данного предположения необходимо провести анализ ядерных генов.

Благородный олень из Якутии, традиционно относящийся к *C. s. sibiricus*, но обладающий смешанным происхождением, не имел следов мтДНК интрогрессии изюбря. По мтДНК он был однозначно ближе к маралу (рис. 1А). Это подтверждает имеющиеся данные о большем сходстве благородного оленя из Якутии и марала по морфометрии тела (Егоров, 1965 по Степанова, Аргунов, 2016а). При этом генетически выборка благородного оленя из Якутии была неоднородна и

образовала две клады, «Якутия 1» и «Якутия 2» (рис. 1А). В разные клады вошли гаплотипы из одних и тех же точек сбора, что свидетельствует об отсутствии географической закономерности в распределении гаплотипов. Олени из группы «Якутия 1» оказались родственны американским вапити. Сходство некоторых якутских и американских гаплотипов ранее уже отмечали Кузнецова с соавторами (2012). Можно сделать предположение о сохранении в Якутии древних гаплотипов, которые были характерны для благородных оленей, участвовавших в колонизации Северной Америки (клада E3 по Doan с соавторами (2018, 2021)). Однако для подтверждения наших предположений необходимо провести анализ древних образцов из Якутии и сравнить с древними и современными американскими гаплотипами. Благородные олени из группы «Якутия 2» оказались родственны маралам из Иркутской области и Красноярского края (был найден один общий гаплотип 209К) (рис. 1А). Судя по всему, мы можем считать Якутию частью ареала марала, однако помнить о возможных миграциях изюбря в данный регион.

Невысокий уровень *Fst*-дифференциации между выборками марала и изюбря и положение группы «маралы 2» могут свидетельствовать о недавнем расхождении и близости подвидов. Однако, несмотря на это, формирование на филогенетическом дереве двух кластеров с высокой поддержкой, отсутствие общих гаплотипов наряду с морфологическими (Гептнер, Цалкин, 1947; Данилкин, 1999) и акустическими (рис. 11) различиями указывают на целесообразность существующего разделения восточного благородного оленя России на подвиды.

Анализ полиморфизма микросателлитных аллелей показал обособленность кластера благородного оленя из Якутии, что свидетельствует об уникальности данной популяции, сохранившей редкие генотипы. Невысокие значения уровня *Fst*-дифференциации подтверждают наше предположение о связи популяций марала, изюбря и благородного оленя из Якутии через бассейны рек и наличии постоянного потока генов между ними. Судя по отсутствию следов мтДНК интрогрессии в выборке из Якутии, основную роль в потоке генов между популяциями играют самцы, которые при расселении активно перемещаются по речным местообитаниям на границе ареалов, что и приводит к смешению генофонда.

### **Филогеографическая структура европейского благородного оленя России**

Популяции европейского благородного оленя России, воронежского *C. e. hippelaphus* и кавказского *C. e. maral*, представляют собой две группы с очень разной историей, которая отражается на их генетической структуре и разнообразии. Построенные нами сеть и дерево демонстрируют все основные гаплогруппы (А-Е), описанные ранее (Ludt et al., 2004; Skog et al., 2009; Niedzialkowska et al., 2011; Doan, 2018, 2021). Воронежский олень, образовавший гаплогруппу Е, – это особая группировка европейского благородного оленя, номинально относящаяся к среднеевропейскому *C. e. hippelaphus*. Он был завезен в середине XIX в. из Германии на территорию современного Воронежского заповедника в количестве всего 10 особей (Павлов и др., 1974; Лихацкий и др., 2012). Согласно литературным данным, к тому моменту местный восточноевропейский благородный олень был полностью истреблен, так что популяция развивалась в условиях фактической генетической изоляции (Лихацкий и др., 2012). Несмотря на это, она успешно разрослась и стала основой для расселения европейского благородного оленя в ходе программы по восстановлению исторического ареала благородного оленя на территории СССР (Павлов и др., 1974; Соломатин, 1974). Несмотря на немецкое происхождение, мы не нашли близкие воронежскому оленю гаплотипы из Европы (рис. 4). Судя по всему, в ходе своего развития в популяции воронежского оленя сохранились редкие гаплотипы, исчезнувшие в Европе.

Большинство современных гаплотипов из различных районов Северного Кавказа и Закавказья вошли в гаплогруппу Е, что соотносится с имеющимися генетическими данными (Кузнецова и др., 2012; Doan et al., 2018, 2021). Близость этих гаплотипов может быть связана как с интродукцией воронежского оленя на территории Кавказа (Александров, 1968), так и с более ранними событиями, не исключая естественное взаимодействие кавказской и восточноевропейской популяций (Верещагин, 1959). Все гаплотипы, описанные нами для музейных образцов благородных оленей из Кавказского заповедника первой половины XX в. (30-х – 40-х гг., то есть до начала программы по расселению), также вошли в гаплогруппу Е (рис. 4). Возможным объяснением является наличие более ранних завозов воронежского оленя на Кавказ (еще в царские времена), но подобное родство гаплотипов также может быть следствием естественного

исторического смешения кавказской и восточноевропейской популяций. Основанные на морфологическом анализе ископаемых остатков данные говорят о том, что до начала резкого сокращения численности кавказская популяция контактировала с восточноевропейской (Верещагин, 1959). Некоторые равнинные популяции или отдельные группировки восточноевропейского благородного оленя, исторически заселяющие юг страны, могли сохраниться и впоследствии смешаться с завезенным воронежским оленем.

Единственный гаплотип, найденный у современных оленей из Кавказского заповедника, а также обнаруженный у оленей из Карачаево-Черкессии и Северной Осетии, образовал отдельную, обособленную гаплогруппу D вместе с гаплотипами древнего оленя Мезолы *C. e. italicus* из Италии (рис. 1Б, 4). Это отражает реликтовое положение популяции благородного оленя из Кавказского заповедника, оленей которой, судя по всему, являются потомком древних маралоидов, населявших Европу и Кавказ до LGM (Borowski et al., 2016; Doan et al., 2017; Meiri et al., 2018).

Кавказский олень России и сопредельных территорий (Северный Кавказ, Закавказье) оказался не родственен кавказскому оленю Ирана и Турции, который образует отдельную гаплогруппу как в нашем, так и в других исследованиях (рис. 4, Кузнецова и др., 2012, 2013; Doan et al., 2018, 2021). Таким образом, наши данные, полученные на большей выборке образцов, подтвердили высказанное Meiri с соавторами (2018) предположение о том, что подвид *C. e. maral* не является монофилетичным.

Микросателлитный анализ показал высокую гомогенность кластера воронежского оленя относительно других выборок европейского благородного оленя (рис. 5). Эффект основателя и несколько бутылочных горлышек, через которые прошла воронежская популяция в ходе своего развития, также, как и развитие в фактической генетической изоляции от других популяций европейского благородного оленя, привели к высокой степени ее генетической обособленности (Лихацкий и др., 2012). По частотам генотипов и уровню *Fst* дифференциации выборка кавказского оленя была ближе к выборкам из Европы, чем к выборке воронежского оленя, несмотря на близкое географическое расположение их ареалов. Некоторые генотипы кавказских оленей по частотам аллелей были ближе к воронежской популяции, чем к европейским, однако мы не нашли следов массовой гибридизации между популяциями кавказского и воронежского оленей (рис.5).

#### 4.2. Генетическое разнообразие благородного оленя *Cervus elaphus s. l.* России

Мы отметили более высокие показатели генетического разнообразия в выборке восточного благородного оленя как по данным яДНК (табл. 3), так и по данным мтДНК (табл. 4, 5) анализов, что может свидетельствовать о меньшем антропогенном стрессе и большем экологическом благополучии по сравнению с европейским благородным оленем (Allendorf, Luikart, 2007). Гаплотипическое и нуклеотидное разнообразие алтайского марала *C. c. sibiricus* и изюбря *C. c. xanthopygus* (табл. 4) было выше, чем у семиреченского марала *C. c. songaricus* из Китая ( $H = 0.522 - 0.767$ ,  $\pi = 0.001 - 0.004$  по Zhou et al., 2015). Показатели генетического разнообразия алтайского марала были выше, чем в других выборках восточного благородного оленя (табл. 4), что подтверждает, что район Алтая/Саян мог быть центром распространения для восточного благородного оленя (Meiri et al., 2018).

Более низкое гаплотипическое и более высокое нуклеотидное разнообразие кавказского оленя из гаплогруппы D (табл. 5) свидетельствует о более древнем происхождении популяции и ее недавнем прохождении через бутылочное горлышко, что повлияло на снижение гаплотипического разнообразия (Avice, 2000). Однако у нас недостаточный размер выборки для однозначных выводов об истории данной группы.

Микросателлитный анализ выявил самые низкие значения показателей генетического разнообразия и малое число приватных аллелей в выборке воронежского оленя (табл. 3), что характерно для популяций благородного оленя, прошедших через одно или несколько бутылочных горлышек (Zachos et al., 2016). Для молодой популяции воронежского оленя (всего 150 лет) основную роль сыграл эффект основателя. Для кавказского оленя было отмечено самое большое число приватных аллелей как при сравнении с другими выборками из России, так и при сравнении с выборками из Европы, что подтверждает его древнее происхождение.

#### 4.3. Оценка потенциального уровня межвидовой гибридизации *C. elaphus* и *C. nippon* с помощью молекулярно-генетического анализа и разработка метода определения гибридов

Оценка уровня гибридизации природных популяций европейского благородного и пятнистого оленей не входила в задачи нашей работы. Однако мы разработали метод, позволяющий выявить межвидовых гибридов с использованием митохондриального и микросателлитного анализов. Так как гибридизация чаще происходит между самками благородного и самцами пятнистого оленей, использование яДНК маркеров необходимо для оценки происхождения по отцовской линии. Нейтрально мутирующие микросателлитные локусы с бипарентальным наследованием оптимально подходят для выявления гибридов (Goodman et al., 1999; Senn, Pemberton, 2009). В результате, была выявлена фенотипически схожая с европейским благородным оленем особь, являющаяся гибридом самки пятнистого и самца европейского благородного оленей (рис. 6), хотя в природе более частыми являются обратные гибридизации (Goodman et al., 1999; Senn, Pemberton, 2009; Senn et al., 2010b; Smith et al., 2018). Все остальные особи фенотипически выглядели как пятнистые олени и несли мтДНК гаплотипы пятнистого оленя, микросателлитный анализ также не выявил следов гибридизации.

#### 4.4. Акустические особенности гонных вокализаций благородного оленя России

В нашем исследовании впервые проведено подробное описание структуры гонных криков благородного оленя *C. elaphus s. l.* России. Выявлены существенные меж- и внутривидовые различия между акустическими параметрами и структурой гонных вокализаций восточного и европейского благородных оленей России. Восточный благородный олень России (марал и изюбрь) издает высокочастотные гонные крики с выраженной частотной модуляцией, тогда как европейский благородный олень России (воронежский и кавказский) издает серии низкочастотных гонных ревов с практически отсутствующей модуляцией. Это хорошо согласуется с литературными данными (Никольский и др., 1979; Frey, Riede, 2013).

Для восточного благородного оленя (марала и изюбря) впервые были описаны паттерны основной частоты гонных криков (рис. 7). Для изюбря ранее были описаны только крики с трапециевидным и понижающимся паттернами (Володин и др., 2015). Для американских вапители пока описаны только крики с трапециевидным паттерном (Bowyer, Kitchen, 1987; Feighny et al., 2006; Reby et al., 2016). Другая впервые отмеченная и прослеженная особенность гонных криков восточного благородного оленя России – высокая встречаемость второй низкой основной частоты. Она была обычна в гонных криках марала, и встречалась реже в криках изюбря. Присутствие в криках восточного благородного оленя второй низкой основной частоты было ранее отмечено для марала (Никольский, 2011; Volodin et al., 2013a) и для североамериканского вапители *C. c. canadensis* (Reby et al., 2016). Низкая основная частота  $f_0$  в гонных криках восточного благородного оленя соответствует по значениям основной частоте гонных ревов европейского благородного оленя (Feighny et al., 2006; Reby et al., 2016).

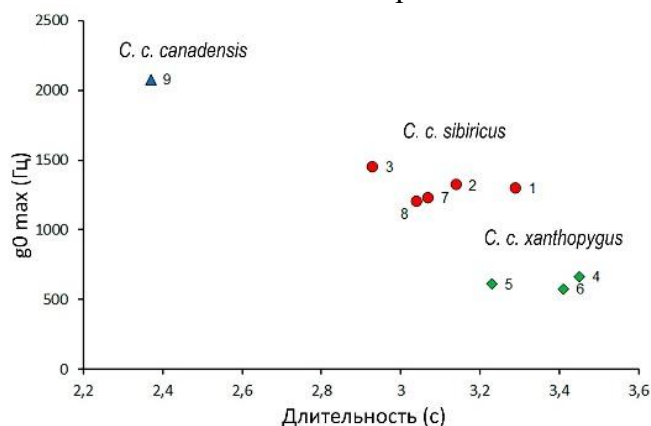
Сравнение акустических параметров гонных криков марала из трех локалитетов показало, что условия обитания оказывают существенное влияние на структуру гонных криков (рис. 8). Высокая основная частота гонных криков оленей из фермерского локалитета (Кострома) может быть обусловлена влиянием содержания в неволе. Лучшее физическое состояние самцов из-за большей доступности корма могло позволить им производить более высокочастотные крики. В то же время, содержание множества животных на небольшой территории могло повысить их уровень стресса и эмоционального возбуждения, что привело к повышению основной частоты их вокализаций (Manteuffel et al., 2004; Briefer, 2012).

Для изюбря было показано влияние фактора популяции на параметры гонных криков самцов (рис. 10). Судя по всему, географическая удаленность популяций друг от друга влияет на акустические различия: более близко расположенные популяции Хабаровского края отличались от популяции Усурийского заповедника по основным частотно-временным параметрам.

При сравнении основной частоты и длительности гонных криков разных подвидов восточного благородного оленя прослеживается обратная зависимость значений основной частоты и длительности (рис. 14). Американский вапители *C. c. canadensis* издает крики с очень высокой основной частотой (максимальная основная частота в среднем равна 2080 Гц, Feighny et al., 2006),



длительность криков при этом относительно небольшая – в среднем 2,4 с (Bowyer, Kitchen, 1987; Feighny et al., 2006). Основная частота гонных криков изюбря гораздо ниже, однако длительность криков заметно больше (рис. 14). Марал имеет промежуточные значения данных параметров (рис. 14). Таким образом, основная частота и длительность гонных криков самцов могут служить надежным диагностическим признаком для подвидов восточного благородного оленя.

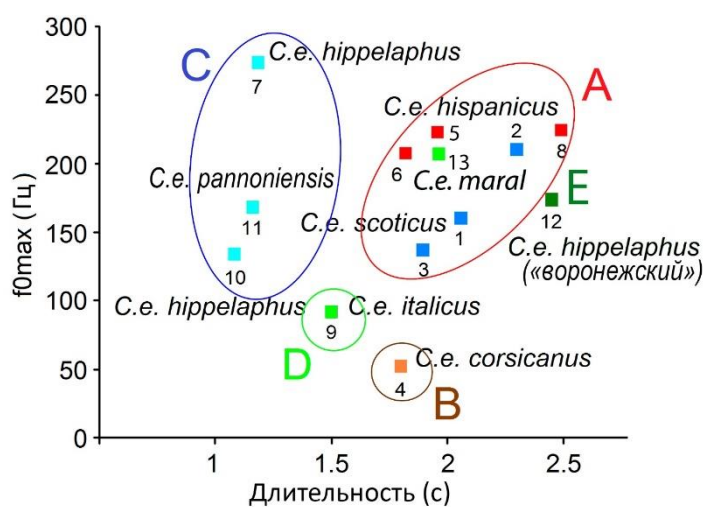


**Рисунок 14.** Положение гонных криков подвидов восточного благородного оленя в координатах максимальной основной частоты и длительности. 1 – это исследование, Хакасский заповедник («Хакасия»); 2 – это исследование, Полубратовское охотничье хозяйство («Тверь»); 3 – это исследование, Костромской мараловодческий комплекс («Кострома»); 4 – это исследование, Уссурийский заповедник («Уссурийск»); 5 – это исследование, Большехецирский заповедник («Хехцир»); 6 – это исследование, Анюйский национальный парк («Аньюй»); 7 – Volodin et al., 2013a; 8 – Volodin et al., 2016a; 9 – Feighny et al., 2006.

Для европейского благородного оленя России показана характерная для этого вида структура гонных вокализаций: бут из нескольких (2-22) ревов с низкой основной частотой (52-274 Гц) (Никольский и др., 1979; Reby, McComb, 2003; Kidjo et al., 2008; Frey et al., 2012; Passilongo et al., 2013; Volodin et al., 2019). Несмотря на то, что полученные нами генетические результаты свидетельствуют о потенциальном родстве и некогда существовавшей связи между благородными оленями европейской части России и Кавказа, их акустические отличия оказались ярко выраженными как на уровне главных ревов, так и на уровне бутов (табл. 6, рис. 13). Сравнимые популяции относятся к разным митохондриальным линиям: D (современный кавказский олень из Кавказского заповедника *C. e. maral*) и E (воронежский олень *C. e. hippelaphus*), и акустические данные поддерживают генетические отличия. Однако, мы также выявили и общие закономерности, характерные для обеих популяций. Так, например, в обеих популяциях главный (самый длинный) рев чаще занимал последнюю позицию в буте (табл. 6), что не так характерно для других европейских популяций (Frey et al., 2012; Volodin et al., 2019). Процент шумовых ревов был сходен в обеих популяциях (табл. 6).

Сравнение значений максимальной основной частоты и длительности гонных ревов европейского благородного оленя из России и Европы показало не столь четкую дифференцированность акустических параметров, как у восточного благородного оленя разных подвидов (рис. 15).

**Рисунок 15.** Положение гонных криков подвидов европейского благородного оленя в координатах максимальной основной частоты и длительности. А – Е – митохондриальные линии (по Skog et al., 2009 и Doan et al., 2018, 2021). Цвета обозначают разные подвиды: зеленый – воронежский олень *C. e. hippelaphus*, салатовый – *C. e. italicus* и *C. e. maral*, красный – *C. e. hispanicus*, синий – *C. e. scoticus*, оранжевый – *C. e. corsicanus*, голубой – *C. e. hippelaphus*. Данные взяты из: 1 – McComb, 1988; 2 – Long et al., 1998; 3 – Reby, McComb, 2003; 4 – Kidjo et al., 2008; 5 – Frey et al., 2012; 6 – Passilongo et al., 2013; 7 – Bocci et al., 2013; 8 – Volodin et al., 2015; 9 – Della Libera et al., 2015; 10 – Hurtado et al., 2012; 11 – Volodin et al., 2019, 12 – воронежский олень *C. e. hippelaphus*, это исследование, 13 – кавказский олень *C. e. maral*, это исследование



В то время как главные ревы воронежского оленя значительно отличались от ревов других европейских популяций, ревы кавказского оленя по максимальной основной частоте и длительности были сходными с ревами испанского оленя *C. e. hispanicus* (рис. 15). Однако сравнение наших данных с данными Frey с соавторами (2012) показало, что кавказский олень сильно отличался от испанского оленя по другим параметрам (количество ревов и положение главного рева в буте, соотношение обычных и шумовых ревов).

#### 4.5. Заключение

Полученные нами генетические и акустические данные поддерживают точку зрения о видовом статусе европейского (*C. elaphus*) и восточного (*C. canadensis*) благородных оленей. Подвиды восточного благородного оленя демонстрируют ярко выраженные генетические и акустические различия, подтверждающие их таксономический статус. Мы подтвердили наличие гибридной зоны в Якутии, однако мы считаем якутского благородного оленя генетически ближе к маралу. Найденные у благородного оленя Якутии гаплотипы указывают на его потенциальное генетическое родство с американскими вапити, что, без сомнения, требует дальнейшего изучения с включением в анализ древних образцов. Подвиды европейского благородного оленя, кавказский *C. e. maral* и номинально относящийся к *C. e. hippelaphus* воронежский, демонстрируют обособленность от оленей Европы. И кавказский, и воронежский олени, без сомнения, обладают высокой ценностью и научной значимостью как популяции, имеющие совершенно разную историю и при этом сохранившие свою генетическую структуру. Особый интерес вызывает выявленная нами с помощью анализа мтДНК связь между кавказским и воронежским оленями, что может свидетельствовать о сохранении на равнинах юга России местных группировок благородного оленя, которые впоследствии смешались с воронежской популяцией. В своей работе мы подтвердили родство благородного оленя из Кавказского заповедника с реликтовым оленем Мезолы, что свидетельствует о сохранении на Кавказе древней автохтонной популяции, а также позволяет предположить существование зоны рефугиума на Кавказе во времена LGM. Безусловно, сохранившаяся благодаря существованию ООПТ популяция Кавказского заповедника вызывает большой научный интерес и требует дальнейшего изучения. Полученные нами акустические данные поддерживают генетические результаты и также показывают своеобразие всех изученных группировок. Для восточного благородного оленя выявлено влияние условий обитания на параметры гонных вокализаций. К сожалению, на данный момент отсутствует централизованный контроль над ввозом в Россию и перемещениями по стране благородных оленей. Это привело к бесконтрольным и незадокументированным интродукциям чужеродных видов и подвидов в нативные популяции. Наша работа может стать основой для определения видовой и подвидовой принадлежности конкретных особей и популяций и степени их генетической «загрязненности» с применением неинвазивных (генетических и акустических) методов, что может быть полезно для сохранения естественной структуры видового комплекса на территории России.

#### ВЫВОДЫ

1. Данные генетического и акустического анализов поддерживают разделение благородного оленя *Cervus elaphus s. l.* России на два вида – европейский благородный олень *C. elaphus* и восточный благородный олень *C. canadensis*.
2. Анализ филогеографической структуры и генетического разнообразия подтверждает предположение о том, что район Алтая/Саян является центром распространения восточного благородного оленя. Марал *C. c. sibiricus* и изюбрь *C. c. xanthopygus* – близкие, но хорошо дифференцируемые по маркерам митохондриальной и ядерной ДНК подвиды *C. canadensis*. Найденны следы предкового полиморфизма или интрогрессии мтДНК изюбря в геном марала.
3. Для благородных оленей Якутии описаны две гаплогруппы мтДНК, одна из которых родственна маралу *C. c. sibiricus*, а другая американским вапити, что может свидетельствовать о сохранении в Якутии генетических линий, участвовавших в колонизации Северной Америки в плейстоцене.
4. Воронежский, относящийся к средневропейскому *C. e. hippelaphus*, и, частично, кавказский *C. e. maral* благородные олени образуют отдельную гаплогруппу. Часть оленей Северного Кавказа оказались генетически близки реликтовому оленю Мезолы *C.e. italicus* с Аппенинского

полуострова, что подтверждает древность их происхождения и полифилетичность подвида *C. e. maral*.

5. Высокие показатели генетического разнообразия по данным полиморфизма митохондриальной и ядерной ДНК в выборке кавказского оленя *C.e. maral* России свидетельствуют о его древнем происхождении. Воронежский олень *C.e. hippelaphus* имеет самые низкие показатели генетического разнообразия, что отражает историю формирования его популяции.
6. Анализ данных полиморфизма гена цитохрома *b* мтДНК и микросателлитных локусов яДНК может быть использован как метод выявления межвидовых и межподвидовых гибридов, особей и популяций смешанного происхождения р. *Cervus*.
7. Основная частота и длительность гонных вокализаций благородного оленя *C. elaphus s. l.* России значительно отличаются на видовом и подвидовом уровнях. Акустическая структура гонных криков восточного благородного оленя зависит от популяции и локалитета. Акустическая структура гонных ревов европейского благородного оленя России зависит от принадлежности к митохондриальной гаплогруппе.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи в рецензируемых научных журналах из перечня ВАК:

1. **Голосова О.С.**, Холодова М.В., Володин И.А., Середкин И.В., Охлопков И.М., Аргунов А.В., Сипко Т.П. Генетическое разнообразие восточных подвидов благородного оленя (*Cervus elaphus*) России по данным полиморфизма мтДНК и микросателлитных локусов // Журнал общей биологии. – 2022. – Т. 83. – №6. – С. 419–433.
2. **Golosoვა O.S.**, Kholodova M.V., Volodin I.A., Volodina E.V., Likhatsky E.Y., Náhlik A., Tari T. Vocal phenotype of male rutting roars and genetic markers delineate East European red deer (*Cervus elaphus*) from Central and West European populations // The Science of Nature. – 2021. – V. 108. – №30.
3. **Golosoვა O.S.**, Volodin I.A., Isaeva I.L., Volodina E.V. Effects of free-ranging, semi-captive and captive management on the acoustics of male rutting calls in Siberian wapiti *Cervus elaphus sibiricus* // Mammal Research. – 2017. – V. 62. – № 4. – P. 387–396.
4. Volodin I.A., Volodina E.V., **Golosoვა O.S.** Automated monitoring of vocal rutting activity in red deer (*Cervus elaphus*) // Russian Journal of Theriology. – 2016. – V. 15. – №2. – P. 91–99.

### Статьи в сборниках

1. Володина Е.В., Володин И.А., **Голосова О.С.** Использование звуковых ловушек для долговременного мониторинга гонной активности популяций марала в центральной России // VI Всемирный Конгресс мараловодов. — Усть-Каменогорск, Казахстан, 2014. — С. 14–18.

### Тезисы конференций:

1. Volodin I.A., Volodina E.V., **Golosoვა O.S.** Longitudinal monitoring of stag calling activity during the rut in two Siberian red deer *Cervus elaphus sibiricus* facilities in Central Russia // Proceeding of the 8th International Deer Biology Congress and International Wildlife Management Symposium. — Northeast Forestry University China, Harbin, 2014. — P. 62–63.
2. **Голосова О.С.**, Володин И.А., Володина Е.В., Сибирякова О.В. Сходство акустической структуры звуков у маралов (*Cervus elaphus sibiricus*) разного пола и возраста // Териофауна России и сопредельных территорий (X съезд Териологического общества при РАН). Материалы международного совещания (1–5 февраля 2016 г.). — Товарищество науч. изд. КМК М, 2016. — С. 89–89.
3. **Голосова О.С.**, Володин И.А., Володина Е.В., Исаева И.Л. Влияние социальной плотности и условий обитания на акустическую структуру гонных криков марала *Cervus elaphus sibiricus* // Материалы Всероссийской научной конференции «Актуальные вопросы современной зоологии и экологии животных». — Издательство ПГУ Пенза, 2016. — С. 32–32.
4. **Golosoვა O.S.**, Volodin I.A., Isaeva I.L., Volodina E.V. Effects of captive and free-ranging



- management on male rutting calls in Siberian wapiti *Cervus elaphus sibiricus* // 8th European Conference of Behavioural Biology, Book of abstracts. — Vienna, 2016. — P. B42–B42.
5. **Голосова О.С.**, Сибирякова О.В., Володин И.А., Володина Е.В. Влияние социальной плотности и эмоционального возбуждения на характеристики криков самцов и самок марала // VI Всероссийская конференция по поведению животных. Материалы научной конференции. М. — Тов-во научных изданий КМК, 2017. — С. 33–33.
  6. **GolosoVA O.S.**, Sibiryakova O.V., Volodin I.A., Volodina E.V. Effects of social density during the rut and arousal at mother-offspring separation on male and female vocalisation traits in Siberian wapiti // 11th International Conference on Behaviour, Physiology and Genetics of Wildlife. — Berlin, IZW, 2017. — P. 53–53.
  7. **Голосова О.С.**, Володин И.А., Холодова М.В., Володина Е.В. Акустическое и генетическое своеобразие благородного оленя (*Cervus elaphus*) юга России // 2nd International Young Scientists Conference on Biodiversity and Wildlife Conservation Ecological Issues, Abstract book. — Yerevan, 2018. — С. 89–91.
  8. Volodina E.V., **GolosoVA O.S.**, Kholodova M.V., Volodin I.A. Population markers of the german origin red deer (*Cervus elaphus hippelaphus*) in Southern Russia: Cytochrome b, microsatellites and the acoustics of rutting calls // Wildlife Research and Conservation 2019, Conference proceedings. — Leibniz-IZW, Berlin, 2019. — P. 181–181.
  9. **Голосова О.С.**, Холодова М.В. Характеристика популяций благородного оленя *Cervus elaphus* России методом микросателлитного анализа // Генетика, селекция, биотехнология: интеграция науки и практики в животноводстве, Материалы международной научно-практической конференции. — ВНИИГРЖ, г. Пушкин, 2021. — С. 34–35.
  10. **GolosoVA O.S.**, Kholodova M.V. Genetic differentiation between Asian subspecies of red deer (*Cervus elaphus*) of Russia: cytochrome b and microsatellite analysis // Abstracts of the 35 IUGB Congress. — Vol. 21. — Vadbiologia, Gogollo, 2021.
  11. **Голосова О.С.**, Громова Ж.Е., Масленников А.В., Холодова М.В. Определение видового и подвидового статуса благородного (*Cervus elaphus*) и пятнистого (*C. nippon*) оленей методом молекулярно-генетического анализа // Млекопитающие в меняющемся мире: актуальные проблемы териологии (XI Съезд Териологического общества при РАН). — Тов-во научных изданий КМК, г. Москва, 2022.
  12. **Голосова О.С.**, Холодова М.В., Трепет С.А., Мурадов А.С. Генетическое своеобразие кавказского благородного оленя *Cervus elaphus maral* по данным полиморфизма митохондриального гена цитохрома b и микросателлитных локусов ядерной ДНК // Вторая всероссийская конференция «Зоологические коллекции как источник генетических ресурсов мировой фауны – классические и современные подходы к их изучению, хранению и использованию», Программа и тезисы докладов. – ЗИН РАН, г. Санкт-Петербург, 2023.