ГЕНЕТИКА, 2021, том 57, № 6, с. 711–720

ГЕНЕТИКА ЖИВОТНЫХ

УДК 599.322.2:575.174(479)

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ПОПУЛЯЦИЙ ГОРНОГО СУСЛИКА (*Spermophilus musicus* Menetries, 1832; Sciuridae, Rodentia) – ОСНОВНОГО НОСИТЕЛЯ ЧУМЫ НА ТЕРРИТОРИИ ЦЕНТРАЛЬНО-КАВКАЗСКОГО ВЫСОКОГОРНОГО ПРИРОДНОГО ОЧАГА

© 2021 г. Е. С. Котенев[1, *], Е. А. Котенева[1], Л. А. Кот[1], А. Ю. Жильцова[1], Д. В. Сердюкова[1], В. В. Сердюков[1], Н. Х. Пшихачев[2], К. Д. Гергоков[2], А. Н. Куличенко[1]

[1]*Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт, Ставрополь, 355035 Россия*

[2]*Кабардино-Балкарская противочумная станция, Нальчик, 360017 Россия*

**e-mail: egor_kotenev@mail.ru*

Поступила в редакцию 10.08.2020 г.
После доработки 16.10.2020 г.
Принята к публикации 30.10.2020 г.

Ареал горного суслика *Spermophilus musicus* простирается в Приэльбрусье и ограничен бассейнами рек Кубань и Черек-Безенгийский, захватывая территорию Центрально-Кавказского высокогорного природного очага чумы. Изучение генетического разнообразия, выполненное по результатам исследования 64 образцов, позволило выявить 14 гаплотипов, сгруппированных в две гаплогруппы. Анализ контрольного региона митохондриальной ДНК позволил установить генетическую дифференциацию между различными поселениями суслика, разделив их на “высокогорные” и “горно-степные”. Наличие значительного генетического разнообразия вероятно связано с длительным межэпизоотическим периодом, наблюдаемым в очаге.

Ключевые слова: горный суслик, мтДНК, С-регион, генетический полиморфизм популяций, природные очаги чумы.

DOI: 10.31857/S0016675821060059

Ареал горного суслика *Spermophilus musicus* (Menetries, 1832) простирается от верховья р. Кубань до р. Черек-Безенгийский. При картографировании, проведенном в 1973–1976 гг., выявлено 234 поселения общей площадью около 97.5 тыс. га. Площадь ареала суслика по крайним поселениям составляет более 331.1 тыс. га, в пределах высот 1150–3200 м н.у.м. [1]. Вид повсеместно представлен отдельными поселениями, разобщенными массивами хвойных и лиственных лесов, реками, участками скал, осыпей и ледниками. Распределение поселений по отдельным участкам не равномерно. Наибольшая площадь их отмечена в центральной части ареала и на западе (плато Бечасын, верховье р. Кубань). В восточной части ареала, в долинах рек Чегем и Черек, поселения в большинстве случаев небольшие [2].

Существенное значение в понимании популяционного разнообразия имеет восстановление истории расселения и обособления отдельных популяций сусликов. Сочетание возможности существования нескольких волн заселения Приэльбрусья сусликами с равнин и длительной изоляции отдельных участков ареала определяет сложный полиморфизм на популяционном уровне [3].

Ареал горного суслика в Приэльбрусье определяет границы Центрально-Кавказского высокогорного природного очага чумы. Периодически или постоянно текущие среди сусликов эпизоотии составляют весьма жесткий фактор естественного отбора. Величина давления этого фактора определяется признаком инфекционной чувствительности к чуме, различающимся у разных популяций. Эти различия детерминированы рядом особенностей, которые обусловливают конституциональные, врожденные механизмы защиты организма [4].

Для установления генетических детерминант необходимо изучить генетическую структуру популяций горного суслика в пределах Центрально-Кавказского высокогорного природного очага чумы. Одним из наиболее часто используемых методов является типирование по фрагменту митохондриальной ДНК (мтДНК).

Таким образом, цель нашей работы – изучение генетической дифференциации популяций (поселений) горного суслика в пределах Центрально-Кавказского высокогорного природного

очага чумы. Для достижения этой цели основной задачей было картографирование поселений животных и определение генетической структуры популяций (поселений) изучаемого вида.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В настоящей работе исследованы 64 образца (селезенки) горного суслика, собранных на территории Кабардино-Балкарской Республики и Карачаево-Черкесской Республики в 2017–2018 гг. Образцы были собраны из 29 поселений (локальных популяций), которые представляют собой стационарные точки сбора материала при плановом ежегодном обследовании территории Центрально-Кавказского высокогорного природного очага чумы.

Места сбора образцов, коллекционные номера указаны в табл. 1 и на рис. 1.

Выделение ДНК проводили с применением набора PureLink Genomic DNA mini Kit, Thermo Fisher Scientific, согласно инструкции производителя.

Для анализа был выбран фрагмент С области мтДНК размером 407 пн, расположенный за геном тРНК-Pro. Амплификацию анализируемого фрагмента осуществляли с использованием праймеров MDL1 5'-TCCACCTTCAACTCCCAAAGC-3' и MDL2R 5'-GGTAGGGGATAGTCATTTGG-3', указанных в работе [5]. Для приготовления реакционной смеси применялся набор ScreenMix-HS (Евроген), согласно инструкции производителя. Объем реакционной смеси составлял 25 мкл. Амплификацию проводили при следующих условиях: предварительная денатурация 95°C – 5 мин, в последующем 35 циклов 95°C – 30 с, 60°C – 30 с, 72°C – 40 с, заключительная элонгация 72°C – 7 мин. Визуализацию полученного фрагмента осуществляли в 2.5%-ном агарозном геле. Очистку ПЦР-продукта из реакционной смеси выполняли с использованием набора Cleanup Standard (Евроген). Реакцию секвенирования проводили набором BigDye Terminator Kit v.3.1 (Applied Biosystems) и праймерами для амплификации. Очистку продукта секвенирования проводили набором Centri-Sep (Princeton Separations). Анализ продукта осуществляли на автоматическом секвенаторе ABI 3500 (Applied Biosystems).

Выравнивание полученных нуклеотидных последовательностей, построение филогенетических деревьев и анализ уровня генетического родства осуществляли в программе Mega 7.0. Топологию филогенетических деревьев подтверждали с использованием метода максимального правдоподобия (Maximum likelihood), по алгоритму Kimura-2. Дифференциацию гаплотипов, расчет генетической дистанции между популяциями (поселениями) и внутри популяций выполняли в программе Arlequin v 3.5.

Анализ молекулярной эволюции осуществляли с использованием методов Байесовой филогении в программном обеспечении BEAST 2.0. Реконструкцию процесса пространственно-временного распространения проводили на основании анализа дискретной филогеографии. Выбор эволюционной модели нуклеотидных замен, наиболее подходящей для анализируемого набора нуклеотидных последовательностей, проводили с использованием программы jModeltest v 2.1.10. Расчет проводился с использованием следующих параметров: модель нуклеотидных замен HKY (–lnL = 619.99BIC = 2021.13), модель молекулярных часов Strick Clock, демографическая модель популяции Coalescent Constant Population, вычисления проводили для 300000000 генераций с шагом 10000. Значения ESS, рассчитанные в Tracer v 1.6 (параметр burn-in 10%), для каждого параметра превышали 800. Построение и аннотацию MCC дерева выполняли в программе Tree Annotator 2.0 (параметр burn-in 10%), для визуализации дерева использовали Fig Tree v 1.4.3.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Из 64 проанализированных последовательностей фрагмента С-региона мтДНК размером 407 пн, выделено 14 гаплотипов (h1–h14) (табл. 2). Всего выявлено 13 SNP. Все выявленные нуклеотидные замены относятся к транзициям (C↔T – 10 SNP; A↔G – 3 SNP).

При построении дендрограммы в программе Mega 7.0 (рис. 2) с использованием метода максимального правдоподобия (Maximum likelihood) выявленные гаплотипы разделились на две гаплогруппы. Дендрограмма отражает тенденцию дифференциации гаплогрупп, связанную с географической (пространственной) структурированностью вида. Прикорневое деление на две основные ветви, соответствующее двум гаплогруппам, обусловлено наличием SNP (C↔T) в позиции 132. В гаплогруппу 1 (SNP – T) вошли гаплотипы h1, h3, h4, h13 и h14. Гаплотипы h13 и h14 отличаются от исходных h1 и h3 вариабельностью нуклеотида в позиции 230 (для h13) и 284 (для h14), поэтому на филогенетическом дереве они входят в состав ветвей, формирующихся за счет гаплотипов h1 и h3.

Гаплогруппа 2 (SNP – C) сформирована следующими гаплотипами: h2, h5, h6, h7, h8, h9, h10, h11, h12. Гаплогруппа 1 менее разнообразна по числу входящих в нее гаплотипов, деление на которые происходит за счет трех SNP (в позициях 303, 313, 316) и двух возможных SNP (позиции 230, 284), которые в дальнейшем вероятно сформируют самостоятельные гаплотипы h13 и h14. Гаплогруппа 2 более структурирована по тополо-

Таблица 1. Характеристика поселений горного суслика и исследованного материала

№	Поселение	Широта	Долгота	*n*	Образцы	Гаплотипы
1	Нижний Калакол	43.47	43.06	2	SU_2017_4.1B, SU_2017_4.2B	h1
2	Калакол	43.47	43.06	2	SU_2017_6.1B, SU_2017_6.2B	h1
3	Верхний Калакол	43.46	43.06	2	SU_2017_7.2B, SU_2017_7.3B	h1
4	Старый Былым	43.45	43.05	8	SU_2017_14.1B, SU_2017_14.2B, SU_2017_14.3B, SU_2018_5.1B, SU_2018_5.2B, SU_2018_5.3B, SU_2018_5.4B, SU_2018_5.5B	h1
5	Былым	43.45	43.03	1	SU_2017_15.1B	h13
6	Ущелье 3	43.43	43.03	1	SU_2018_1.1B	h1
7	Нижний Мыстыкам	43.45	43.02	2	SU_2017_5.1B, SU_2017_5.2B	h1
8	Былым-огороды	43.45	43.01	2	SU_2017_11.1B, SU_2017_11.2B	h1
9	Аммональный склад	43.44	43.01	2	SU_2017_13.3B, SU_2017_13.4B	h1
10	Пёрк	43.43	42.97	4	SU_2017_2.2B, SU_2018_6.1B, SU_2018_6.3B, SU_2018_6.4B	h1/h3
11	Тырныауз ФЗО	43.41	42.92	2	SU_2017_8.1B, SU_2017_8.3B	h3
12	Тырныауз ЖБИ	43.40	42.92	4	SU_2017_12.1B, SU_2017_12.2B, SU_2017_12.3B, SU_2018_4.4B	h3/h14
13	Комсомольское озеро	43.32	42.79	3	SU_2018_3.1B, SU_2018_3.2B, SU_2018_3.4B	h2
14	Кюллюм	43.47	43.05	2	SU_2017_9.1B, SU_2017_9.2B	h4
15	Верхний Алмалы	43.47	43.01	2	SU_2017_3.1B, SU_2017_3.2B	h4
16	Нижний Алмалы	43.45	43.01	1	SU_2017_1.2B	h1
17	Кырбаши	43.45	42.98	2	SU_2017_17.2B, SU_2017_17.3B	h4
18	Гижгит-2, 10 км	43.46	42.98	2	SU_2017_10.1B, SU_2017_10.2B	h4
19	Гижгит-2, 5 км	43.47	42.99	2	SU_2018_2.3B, SU_2018_2.5B	h4

Таблица 1. Окончание

№	Поселение	Широта	Долгота	*n*	Образцы	Гаплотипы
20	Гижгит-1	43.47	42.96	3	SU_2018_7.2B, SU_2018_7.3B, SU_2018_7.6B	h4
21	Джаурген	43.42	42.84	1	SU_2017_8.3E	h6
22	Канжол	43.53	42.70	1	SU_2017_18.1B	h10
23	Кыртык	43.36	42.68	3	SU_2017_16.2B, SU_2017_16.3B, SU_2017_16.4B	h11/h12
24	Шауком	43.42	42.67	1	SU_2017_2.3E	h6
25	Гитче-Талыкол	43.46	42.56	1	SU_2017_3.3E	h7
26	Кызылкол	43.46	42.53	1	SU_2017_6.1E	h8
27	Арбакол	43.71	42.51	3	SU_2017_5.1X, SU_2017_5.2X, SU_2017_5.3X	h9
28	Арбакол	43.70	42.49	2	SU_2017_1.1X, SU_2017_1.2X	h5
29	Урусбикол	43.70	42.50	2	SU_2017_7.2X, SU_2017_7.3X	h9

Примечание. *n* – число исследованных образцов из поселения.

Таблица 2. Характеристика гаплотипов, выявленных при исследовании фрагмента С-региона мтДНК горного суслика

Гаплотип	SNP												
	132	206	209	230	280	284	287	303	313	315	316	317	318
h6	C	T	T	C	A	T	T	T	G	T	A	C	C
h4	T	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
h1	T	–	–	–	–	–	–	–	–	–	G	–	–
h13	T	–	–	**Y**	–	–	–	–	–	–	G	–	–
h3	T	–	–	–	–	–	–	C	A	–	–	–	–
h14	T	–	–	–	–	**Y**	–	C	A	–	–	–	–
h7	–	–	–	T	–	–	–	–	–	–	–	–	–
h9	–	–	–	T	G	–	–	–	–	–	–	–	–
h5	–	–	–	T	G	–	–	–	–	–	–	–	T
h8	–	–	–	T	G	–	–	–	–	–	–	T	–
h12	–	–	–	T	–	–	–	–	–	–	–	T	–
h11	–	–	–	T	–	–	C	–	–	–	–	T	–
h10	–	C	–	T	–	–	–	–	–	C	–	–	–
h2	–	–	C	–	–	–	–	–	–	–	–	T	–

гии входящих в ее состав ветвей и большему количеству гаплотипов.

Гаплотипы h1, h3, h4, h13 и h14, входящие в гаплогруппу 1, располагаются компактно, в пределах высот 1100–1700 м н.у.м., относящихся к ландшафтному поясу – горная степь. Пространственное распределение гаплотипов h1 и h4 обусловлено наличием фактора природной изоляции

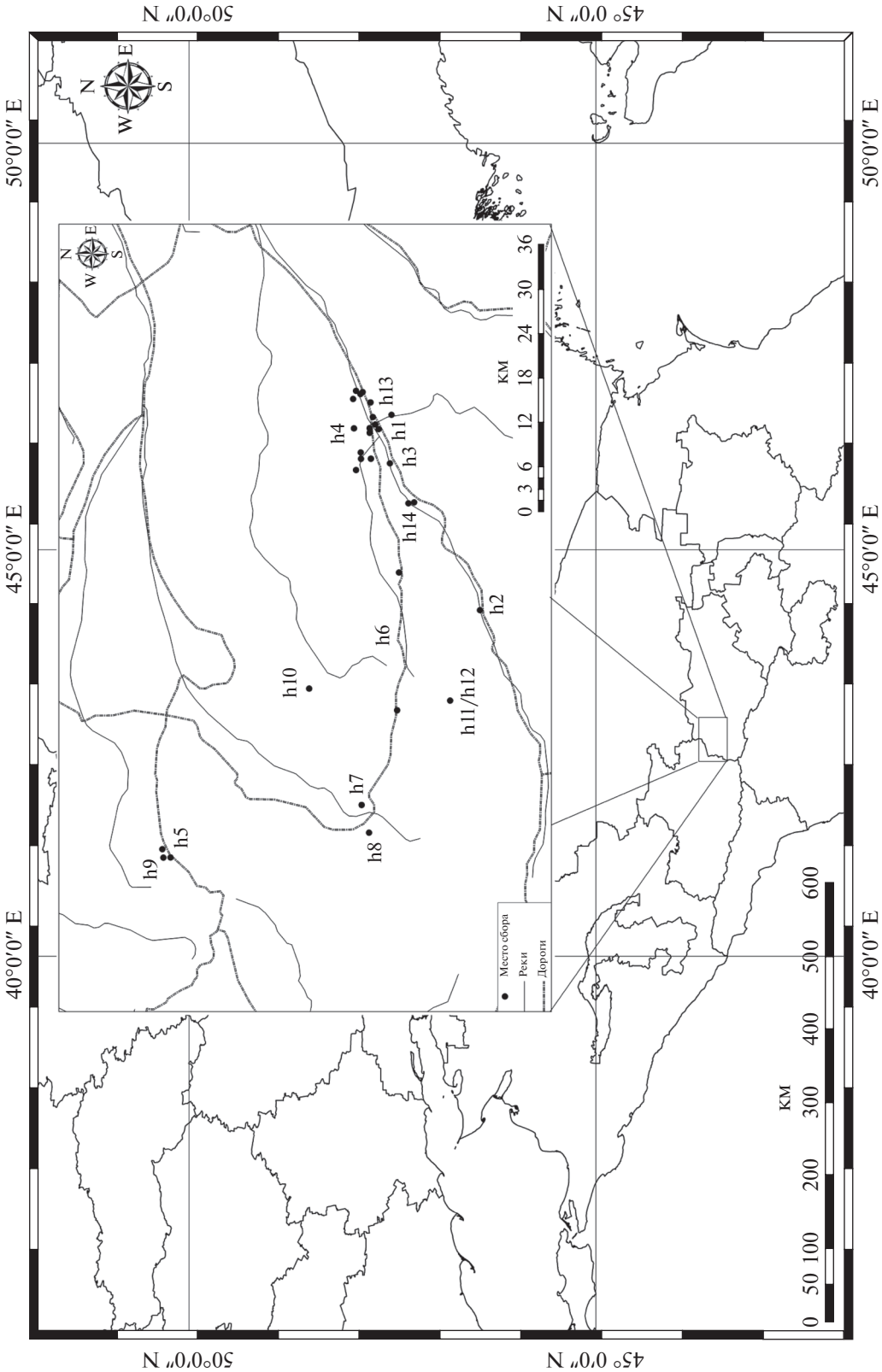

Рис. 1. Карта сбора образцов *Spermophilus musicus* и территориального распределения выявленных гаплотипов.

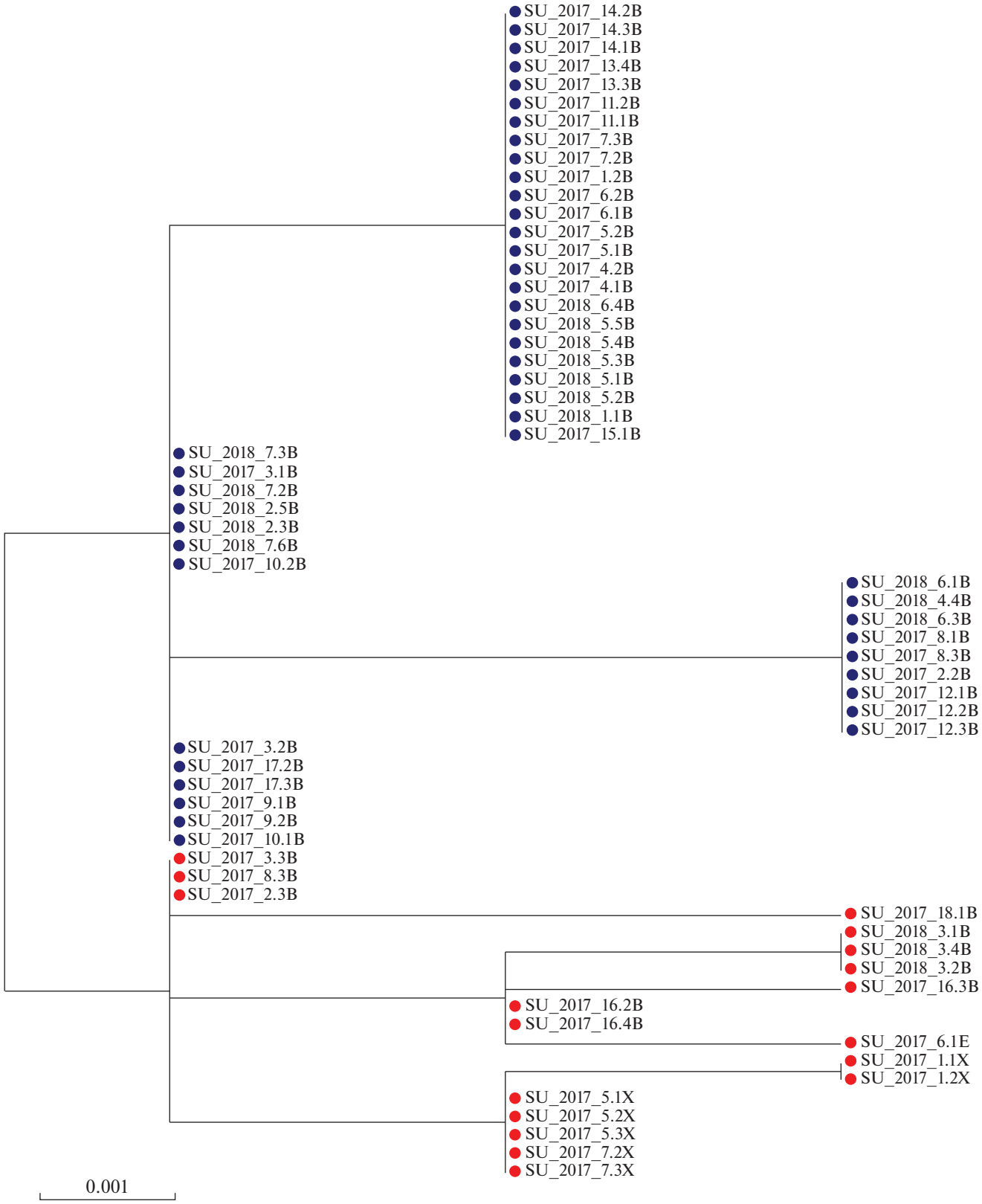

Рис. 2. Филогенетическое дерево по фрагменту C-региона мтДНК (407 пн), построенное методом максимального правдоподобия (Maximum likelihood), алгоритм Kimura-2. Маркерами отмечены гаплогруппа 1 (синий) и гаплогруппа 2 (красный).

между частями ареала (р. Баксан). Данные гаплотипы составляют основу гаплогруппы 1. На левом берегу реки распространен гаплотип h4, в пределах высот 1200–1700 м н.у.м., на правобережье распространен гаплотип h1, в пределах высот 1100–1200 м н.у.м. Наличие водной преграды не обеспечивает полной изоляции между данными гаплотипами, отмечается частичное проникновение особей с гаплотипом h1 на левый берег реки, ввиду наличия моста возле населенного пункта Былым. Гаплотипы h1 и h4 близки между собой и отличаются друг от друга только по SNP (A↔G) в позиции 316. Гаплотип h13 расположен в боковой части поселения горного суслика, с гаплотипом h1. Отмечается наличие неоднородности в данном локальном поселении, проявляющееся в вариабельности нуклеотида (Y) в позиции 230. Гаплотип h3 распространен вдоль русла, по обеим сторонам р. Баксан, но выше по течению. Этот гаплотип отличается от гаплотипов h1 и h4 наличием однонуклеотидных замен в позициях 303 (T↔C) и 313 (G↔A) и на дендрограмме (рис. 3) образует отдельную ветвь с примыкающим к ней гаплотипом h14.

На правом берегу располагается гаплотип h14, для которого также отмечена неоднородность (Y) в позиции 284, с гаплотипом h3.

Гаплотипы h2, h5, h6, h7, h8, h9, h10, h11, h12, входящие в гаплогруппу 2, занимают более обширный ареал, располагаясь в субальпийской и альпийской ландшафтных зонах, в пределах высот 1700–2800 м н.у.м. Следует отметить, что образцы с гаплотипом h6 встречаются в точках, расположенных на значительном удалении друг от друга.

Для выяснения связи генетической структуры популяции горного суслика, представленной отдельными поселениями, с географическим распространением особей было проведено попарное сравнение поселений на основе критерия F_{ST}. Как показывает матрица значений F_{ST}, поселения 1–9 практически не различаются между собой и имеют одинаковый гаплотип h1. Таким образом, можно сказать, что эти поселения являются частью одной популяции, занимающей участок горной степи по правому берегу р. Баксан. Сюда же согласно данным генетического анализа, подтвержденного матрицей сравнения F_{ST}, относится поселение № 16 (Нижний Алмалы). Аналогично достаточно однородную группу образуют поселения № 14–20 (за исключением поселения № 16), которые занимают левый берег р. Баксан. Между остальными поселениями различия в генетической структуре значительно выше, что подтверждается матрицей значений F_{ST}. Наиболее различающимися по своей генетической структуре являются поселения № 21–29, которые располагаются изолированно и на больших расстояниях друг от друга в альпийском и субальпийском поясах Центрально-Кавказского высокогорного очага чумы.

Нами было подсчитано число различий внутри и между поселениями (рис. 4). В двух поселениях – 10 и 23 выявлены достоверные различия между особями внутри одного поселения, что может указывать на неполную изоляцию данных поселений, в связи с чем в них наблюдается приток/обмен генетическим материалом.

Таким образом, на основании исследований изолированности поселений и генетической структуры входящих в них особей, в соответствии с выявленными гаплотипами, нами выделены 14 популяций горного суслика.

ОБСУЖДЕНИЕ

Рассматривая чуму как фактор естественного отбора, при анализе распространения и представленности гаплотипов, следует иметь в виду неравноценность и неоднородность в эпизоотическом отношении территории горных очагов чумы. Так, на высокогорных участках природных очагов (в субальпийском и альпийском высотных поясах) индекс эпизоотичности, свидетельствующий о частоте заболевания чумой животных, значительно выше, чем на участках, относящихся к горной степи [4].

Ранее точки сбора материала характеризовались высокой частотой эпизоотий, что позволило нам ожидать относительно небольшого уровня генетического разнообразия, так как под селективным действием эпизоотий в популяциях (отдельных поселениях) преимущество в размножении получат резистентные к чуме особи. Возможно, большое число выявленных нами гаплотипов является результатом длительного межэпизоотического периода.

Характерной особенностью высокогорных природных очагов чумы является прерывистость поселений носителей, связанная с неоднородностью и мозаичностью ландшафта. Эта прерывистость находит свое отражение в генетической структуре популяции горного суслика в разных частях Центрально-Кавказского высокогорного природного очага чумы, в зависимости от высотной поясности. В пределах части горной степи, где наблюдаются более благоприятные условия для жизнедеятельности по сравнению с высокогорной частью (субальпийская и альпийская зона), генетическая структура поселений более однородна. Различия между гаплотипами, образующими гаплогруппу 1, минимальны и не превышают двух нуклеотидов. В высокогорной части очага природно-климатические условия более суровы, изоляция между поселениями обеспечивается наличием непреодолимых физических преград, поэтому

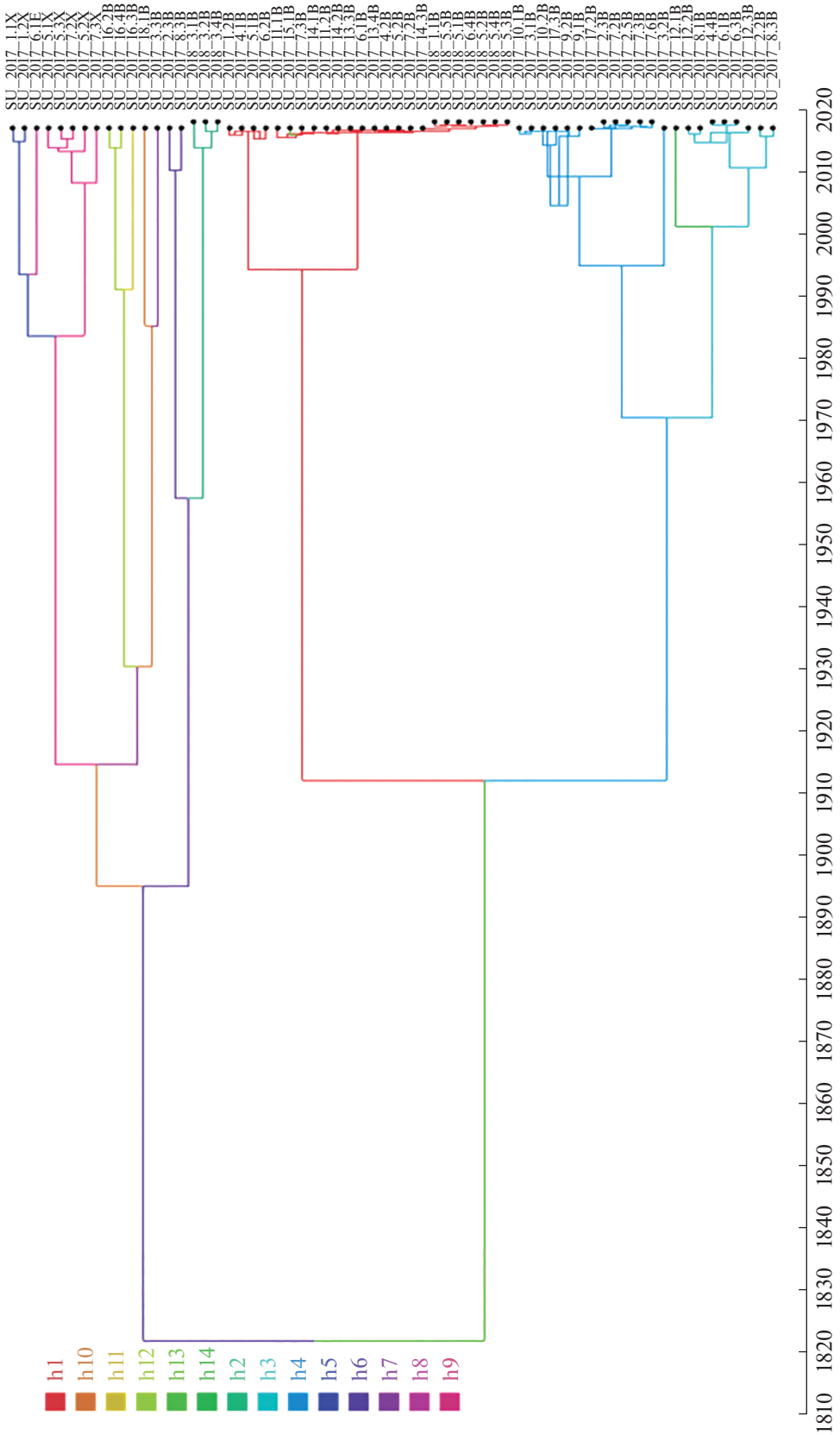

Рис. 3. Байесовское датированное филогенетическое дерево (MCC), построенное на основании анализа С-региона мтДНК. Цветом обозначены выявленные гаплотипы.

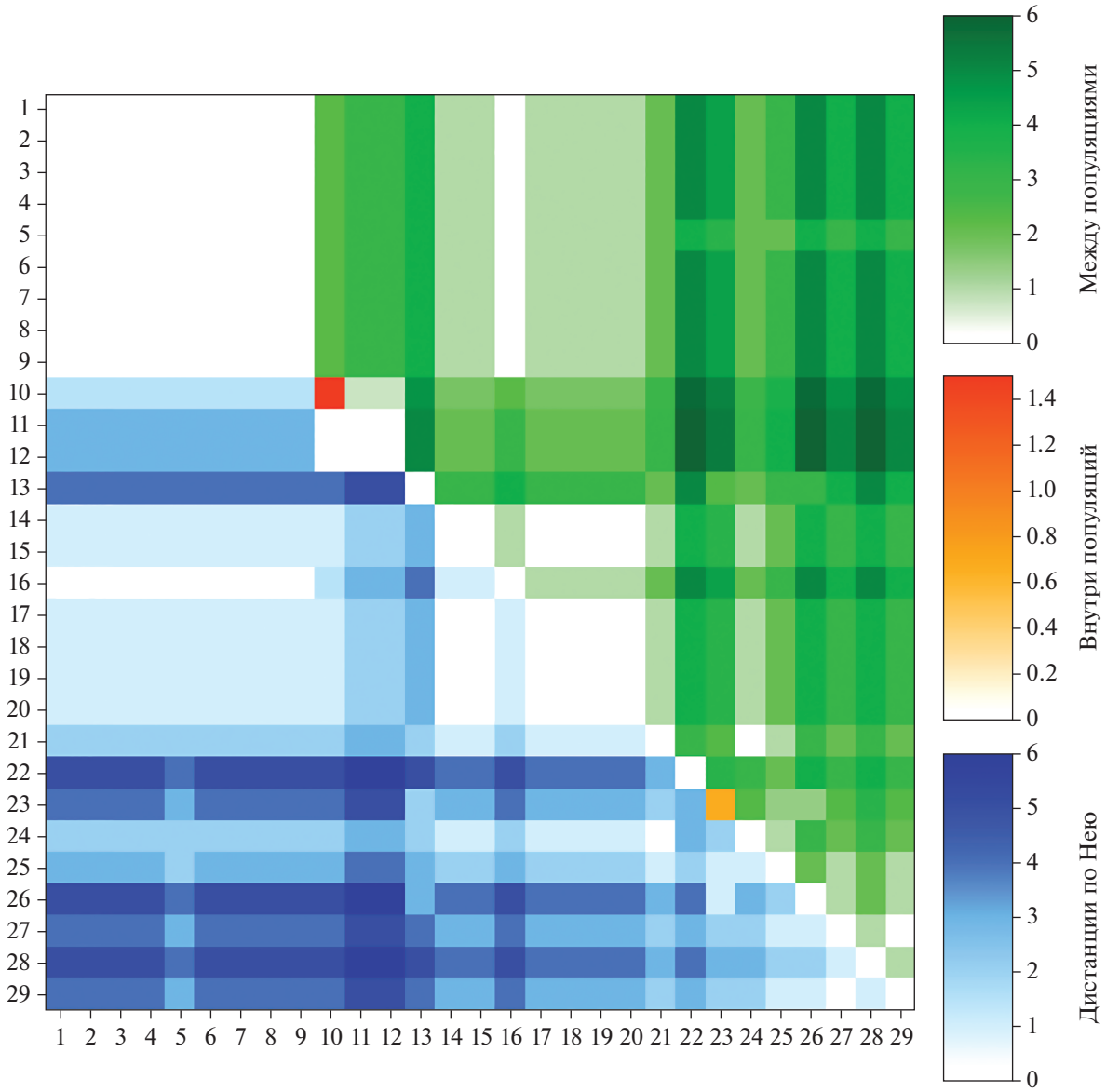

Рис. 4. Среднее число парных различий внутри и между поселениями горного суслика.

“высокогорная” гаплогруппа 2 более разнообразна по своему составу.

При анализе филогенетических взаимоотношений методом Байесовой филогении (рис. 3) видно, что разделение популяции на две обособленные ветви, впоследствии оформившиеся в гаплогруппы 1 (Т) и 2 (С), произошло в начале XIX в. и в течение длительного периода (почти 100 лет) каждая из этих ветвей существовала в виде мономорфной генетической группы. Деление на более мелкие ветви, соответствующие современным гаплотипам, началось в каждой группе в разные сроки, с интервалом 10–20 лет в начале XX в. В гаплогруппе 2 (С) – “высокогорной” формирование современных гаплотипов началось несколько раньше, в конце XIX в., и продолжалось достаточно интенсивно на протяжении всего XX в. В то же время гаплогруппа 1 (Т), разделившись в начале XX в. на две большие подгруппы, впоследствии давшие начало гаплотипам h1, h3, h4, существовала в стабильном состоянии до 60–70 гг. XX в., когда началось бурное разделение достаточно однородной в генетическом отношении популяции на отдельные гаплотипы. Совершенно очевидно, что на гаплогруппу 1 (Т) – “горностепную” в значительно большей степени оказывал влияние антропогенный фактор, чем на “высокогорную” гаплогруппу 2 (С). В то же время именно в “высокогорной” части очага были отмечены наиболее масштабные и длительные эпизоотии чумы, которая выступила в качестве селективного фактора

естественного отбора. Влияние антропогенного фактора на высокогорную популяцию суслика значительно менее выражено. Возможно, это связано с активным проведением в 70–80 гг. противоэпидемических мероприятий, направленных на оздоровление Центрально-Кавказского высокогорного природного очага чумы, а не с хозяйственной деятельностью человека.

Полученные нами результаты изучения фрагмента С-региона мтДНК свидетельствуют о влиянии фактора изоляции (пространственной и высотной) отдельных поселений на генетическую структуру популяции горного суслика в целом в данном ареале.

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Григорьев М.П.* Анализ популяционной структуры носителей в Центрально-Кавказском природном очаге чумы: Дис. ... канд. биол. наук. Ставрополь: Ставропольский н.-и. противочумный институт, 1998. 124 с.
2. *Голубев П.Д., Варшавский С.Н., Акиев А.К., Шилов М.Н.* Некоторые вопросы истории ареала и возраста поселений горного суслика // Экология, методы изучения и организация охраны млекопитающих горных областей. Свердловск, 1977. С. 30–31.
3. *Гниловская Ю.Г.* Об истории формирования ареала горного суслика в Приэльбрусье // Особо опасные инфекции на Кавказе. Ставрополь, 1987. С. 288–290.
4. *Дятлов А.И.* Эволюционные аспекты природной очаговости чумы. Ставропольское кн. изд-во, 1989. 197 с.
5. *Ермаков О.А., Симонов Е.П., Сурин В.Л., Титов С.В.* Внутривидовой полиморфизм контрольного региона митохондриальной ДНК и филогеография малого суслика (*Spermophilus pygmaeus*, Sciuridae, Rodentia) // Генетика. 2018. Т. 54. № 11. С. 1316–1326. https://doi.org/10.1134/S0016675818110048

Genetic Diversity of Populations of Mountain Ground Squirrel (*Spermophilus musicus* Menetries, Sciuridae, Rodentia), the Main Carrier of the Plague, in the Territory of the Central Caucasian High-Mountain Natural Focus

E. S. Kotenev[a, *], E. A. Koteneva[a], L. A. Kot[a], A. Yu. Zhiltsova[a], D. V. Serdyukova[a], V. V. Serdyukov[a], N. Kh. Pshikhachev[b], K. D. Gergokov[b, †], and A. N. Kulichenko[a]

[a]*Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, 355035 Russia*
[b]*Kabardino-Balkarian Anti-Plague Station, Nalchik, 360017 Russia*
**e-mail: egor_kotenev@mail.ru*

The range of the mountain ground squirrel *Spermophilus musicus* extends in the Elbrus region and is limited by the basins of the Kuban and Cherek-Bezengi rivers, capturing the territory of the Central Caucasian high-mountain natural plague focus. The study of genetic diversity, carried out according to the results of the study of 64 samples, made it possible to identify 14 haplotypes, grouped into two haplogroups. Analysis of the control region of mitochondrial DNA made it possible to establish genetic differentiation between its various settlements, dividing them into “high-mountainous” and “mountain-steppe” ones. The presence of significant genetic diversity is probably associated with the long interepizootic period observed in the outbreak.

Keywords: mountain ground squirrel, mtDNA, C-region, genetic polymorphism of populations, natural foci of plague.