

УДК 599.323.4

## ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЕ СВЯЗИ ТРЕХ ВИДОВ ПОЛЕВОК ПОДРОДА *Terricola* (Rodentia, Arvicolinae, *Microtus*): РЕЗУЛЬТАТЫ АНАЛИЗА ФРАГМЕНТОВ ЯДЕРНЫХ ГЕНОВ *BRCA1* И *XIST*

© 2020 г. А. С. Богданов<sup>\*,@</sup>, Л. А. Хляп<sup>\*\*</sup>, М. И. Баскевич<sup>\*\*</sup>

<sup>\*</sup>Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, ул. Вавилова, 26, Москва, 119334 Россия

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

<sup>@</sup>E-mail: bogdalst@yahoo.com

Поступила в редакцию 27.11.2019 г.

После доработки 06.05.2020 г.

Принята к публикации 06.05.2020 г.

Впервые на основе анализа нуклеотидных последовательностей фрагментов экзона 11 гена *BRCA1* (1473 п.н.) и гена *XIST* (415 п.н.) ядерной ДНК определены филогенетические отношения, различия и изменчивость трех видов полевок рода *Microtus*, подрода *Terricola*: *M. majori*, *M. daghestanicus* и *M. subterraneus*. Полученные данные показывают значительную генетическую разобщенность этих видов и обособленное положение *M. majori* по отношению к *M. daghestanicus*–*M. subterraneus*. По гену *XIST* обнаружена слабая дифференциация *M. majori* на северокавказскую и закавказскую популяционные группировки, а по фрагментам обоих ядерных генов – неожиданно высокая внутривидовая изменчивость *M. daghestanicus* вне отчетливой связи с географическим происхождением животных. Предполагается, что различия в характере внутривидового генетического полиморфизма у *M. daghestanicus* и *M. majori* обусловлены их экологическими особенностями.

DOI: 10.31857/S0002332920060028

Кустарниковые полевки, обитающие в горных и равнинных ландшафтах большей части Европы, Закавказья и Малой Азии, в настоящее время относятся к роду *Microtus* и подроду *Terricola*; последний представлен 13–14 видами (Chaline *et al.*, 1988; Павлинов, 2003; Musser, Carleton, 2005). Несмотря на устойчивый интерес к подроду *Terricola* и значительный прогресс в его изучении, видовые особенности, генетическая дифференциация и родственные отношения кустарниковых полевок требуют уточнения. Особый интерес представляют кустарниковая и дагестанская полевки (*M. majori* Thomas, 1906 и *M. daghestanicus* Shidlovskii, 1991 соответственно) – кавказские эндемики, частично проникающие в Понтийские горы, а также более широко распространенный европейско-малоазиатский вид подземная полевка *M. subterraneus* de Selys-Longchamps, 1836. Эти виды существенно отличаются по экологическим особенностям, кариотипическим, молекулярно-генетическим признакам и характеру внутривидового полиморфизма. Так, *M. majori* стабилен по числу хромосом ( $2n = 54$ ), у *M. subterraneus* обнаружены три хромосомных формы: одна с  $2n = 52$  и две с  $2n = 54$  (Macholan *et al.*, 2001; Baskevich *et al.*, 2018). У дагестанской полевки выявлен робертсоновский веер ( $2n = 54$ ,

$53, 52, 46, 45, 44, 43, 42$ "А",  $42$ "В",  $40, 38$ ;  $NF = 58$ ), сведения о котором были обобщены ранее (Ахвердян и др., 1992), причем некоторые исследователи выделяют низкохромосомные формы  $2n = 42$ "А" и  $2n = 38$  в самостоятельный вид *M. nasarovi* Shidlovsky, 1938 (Хатухов и др., 1978). Проведенный на ограниченных выборках сравнительный анализ полной последовательности митохондриального гена цитохрома *b* (*cytb*) (Jaarola *et al.*, 2004; Baskevich *et al.*, 2016, 2018; Баскевич и др., 2017) выявил как некоторые общие черты в характере внутривидовой дифференциации подземной, дагестанской и кустарниковой полевок (у всех видов наиболее обособленными оказались малоазиатские выборки), так и существенные различия. По числу обнаруженных внутривидовых группировок и генетическим дистанциям между ними *M. daghestanicus* – наиболее гетерогенный вид, несмотря на принадлежность изученных популяций к одной хромосомной форме,  $2n = 54$  (Baskevich *et al.*, 2016; Баскевич и др., 2017).

Родственные связи между видами подрода *Terricola* оцениваются неоднозначно. Предлагалось рассматривать *M. majori* и *M. daghestanicus* в составе понтийско-кавказской группы видов на основании их морфологического сходства и по зоогео-

**Таблица 1.** Собственный материал по трем видам полевков подрода *Terricola*, использованный при секвенировании фрагментов ядерных генов *BRCA1* и *XIST*

Вид	Пункт отлова и географические координаты (град)		Коллекционный номер животного
<i>M. subterraneus</i>	Россия, Новгородская обл., Валдайский р-н, Валдайский Национальный парк, окр. оз. Кренье (57.98 с.ш., 33.38 в.д.)		11-57 (54-хромосомная форма)
	Россия, Калужская обл., Ульяновский р-н, окр. дер. Нагая, “Калужские засеки” (53.57 с.ш., 35.74 в.д.)		13-180, MS-1 (54-хромосомная форма)
	Россия, Воронежская обл., Верхнехавский р-н, правобережье р. Усманка (51.94 с.ш., 39.68 в.д.)		03-67 (52-хромосомная форма)
	Россия, Белгородская обл., Губкинский р-н, Белогорье (51.18 с.ш., 37.65 в.д.)		694 (предположительно, 52-хромосомная форма)
<i>M. daghestanicus</i>	Россия, Кабардино-Балкария, Эльбрусский р-н, ущелье Адыл-Су (43.21 с.ш., 42.68 в.д.)		10-2, 10-51, 10-12
	Россия, Кабардино-Балкария, Зольский р-н, Экипцоко (43.68 с.ш., 43.08 в.д.)		11-22
	Россия, Северная Осетия–Алания, Алагирский р-н, Нижний Цей (42.80 с.ш., 43.94 в.д.)		10-88
<i>M. majori</i>	Россия, Ставропольский край, Шпаковский р-н, гора Стрижамент (44.82 с.ш., 42.03 в.д.)		13-15
	Россия, Краснодарский край, Адлерский р-н	окр. Хмелевских озер (43.71 с.ш., 40.2 в.д.)	253
		хр. Псехако (43.54 с.ш., 39.95 в.д.)	312
	Абхазия, окр. г. Сухум (43.00 с.ш., 40.98 в.д.)		16-7
	Армения, Лорийская обл., окр. пос. Лермонтово (40.76 с.ш., 44.62 в.д.)		24710

графическому принципу (Kratochvil, Kral, 1974; Миронова и др., 2013). Другие авторы считали более близкими *M. subterraneus* и *M. majori*, как по морфологии (Chaline *et al.*, 1988), так и по спектрам аллозимов (Macholan *et al.*, 2001). По мнению Загороднюка (Загороднюк, 1988), кустарниковую полевку следует отнести к отдельной группе “majori” по кариотипическим особенностям. Почти все полученные позднее аллозимные и молекулярно-генетические данные (Межжерин и др., 1995; Jaarola *et al.*, 2004; Baskevich *et al.*, 2016, 2018; Баскевич и др., 2017) подтверждают последнюю точку зрения и свидетельствуют о наибольшей обособленности *M. majori* от *M. subterraneus* и *M. daghestanicus*.

Очевидно, что дальнейшее изучение изменчивости, дифференциации и филогенетических отношений видов подрода *Terricola* требует привлечения дополнительных молекулярно-генетических маркеров, в том числе ядерных. Анализ фрагментов ядерной ДНК также был бы весьма полезным для подтверждения высокой дифференциации видов кустарниковых полевков, ранее установленной по митохондриальным генам (Ja-

rola *et al.*, 2004; Baskevich *et al.*, 2016, 2018; Баскевич и др., 2017).

Цель работы – определение внутривидовых и межвидовых различий у *M. majori*, *M. daghestanicus* и *M. subterraneus* по нуклеотидным последовательностям фрагментов двух генов ядерной ДНК: экзона 11 гена *BRCA1* (Breast cancer 1) и гена *XIST* (X-inactive specific transcript).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Использованный в настоящем исследовании собственный материал по полевкам подрода *Terricola* представлен в табл. 1. В качестве аутгруппы в анализ включен экземпляр *Microtus obscurus* из окр. пос. Лермонтово Лорийской обл. Армении (№ 24709).

ДНК была выделена из фиксированных в этаноле образцов печени или почек методом фенол-хлороформной депротеинизации с использованием протеиназы К (Sambrook *et al.*, 1989). Для амплификации и секвенирования участков генов *BRCA1* и *XIST* использовались самостоятельно разработанные пары праймеров: для анализа гена *XIST* – Xist1-L11841 (5'-GGG-GTC-TCT-GGG-

ААС-АТТ-ТТ-3')/Xist1-R12504 (5'-TGC-AAT-AAC-TCA-CAA-AAC-CAA-C-3') либо Xist1-Rint (5'-AAG-CAG-GTA-AGT-ATC-CAC-AGC-3'), а для гена *BRCA1* – *BRCA1*-1F-EII (5'-GAT-GTA-ACA-AAT-ACT-GAG-CAG-CAT-CA-3')/*BRCA1*-M1R-EII (5'-GAC-TTG-GAT-TCC-TAC-CGA-CTG-3') и *BRCA1*-M1F (5'-ACG-TCC-ACA-GTT-CAA-AAG-CAC-STA-3')/*BRCA1*-M2R-EII (5'-GCT-ACT-TTC-GTG-TCT-CGG-TGG-AT-3'). Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в смеси, содержащей 30 нг тотальной ДНК, 2 мкл  $10 \times$  Taq-буфера, 1.6 мкл 2.5 mM раствора dNTP, 4 pM каждого праймера, единицу Taq-полимеразы и деионизированную воду до конечного объема 20 мкл. Амплификация была выполнена на приборе ТЕРЦИК (Россия) по следующей программе: предварительный прогрев при 94°C (3 мин), далее 35 циклов в последовательном режиме: 30 с – 94°C, 1 мин – 60–63°C, 1 мин – 72°C; в завершение реакции проведена однократная финальная элонгация ПЦР-продуктов при 72°C (6 мин). Автоматическое секвенирование осуществлено с использованием кита ABI PRISM®BigDye™ Terminator v. 3.1 (ABI, США) в ИБР РАН на генетическом анализаторе AB 3500 (ABI, США). После выравнивания длина определенной у всех полевок нуклеотидной последовательности фрагмента экзона 11 гена *BRCA1* составила 1473 пары нуклеотидов (п.н.), а участка гена *XIST* – 415 п.н. с учетом делеций/вставок.

Статистическая обработка молекулярно-генетических данных выполнена с помощью компьютерной программы Mega 6.06 (Tamura *et al.*, 2013). При построении дендрограмм по методу Maximum Likelihood (ML) и расчете генетических дистанций (*D*) для обоих генов в отдельности и их суммированной последовательности использована модель TN93 (Tamura-Nei model) – одна из наиболее подходящих по показателю BIC (Bayesian Information Criterion). Значения бутстреп-индекса определены по тысяче репликаций.

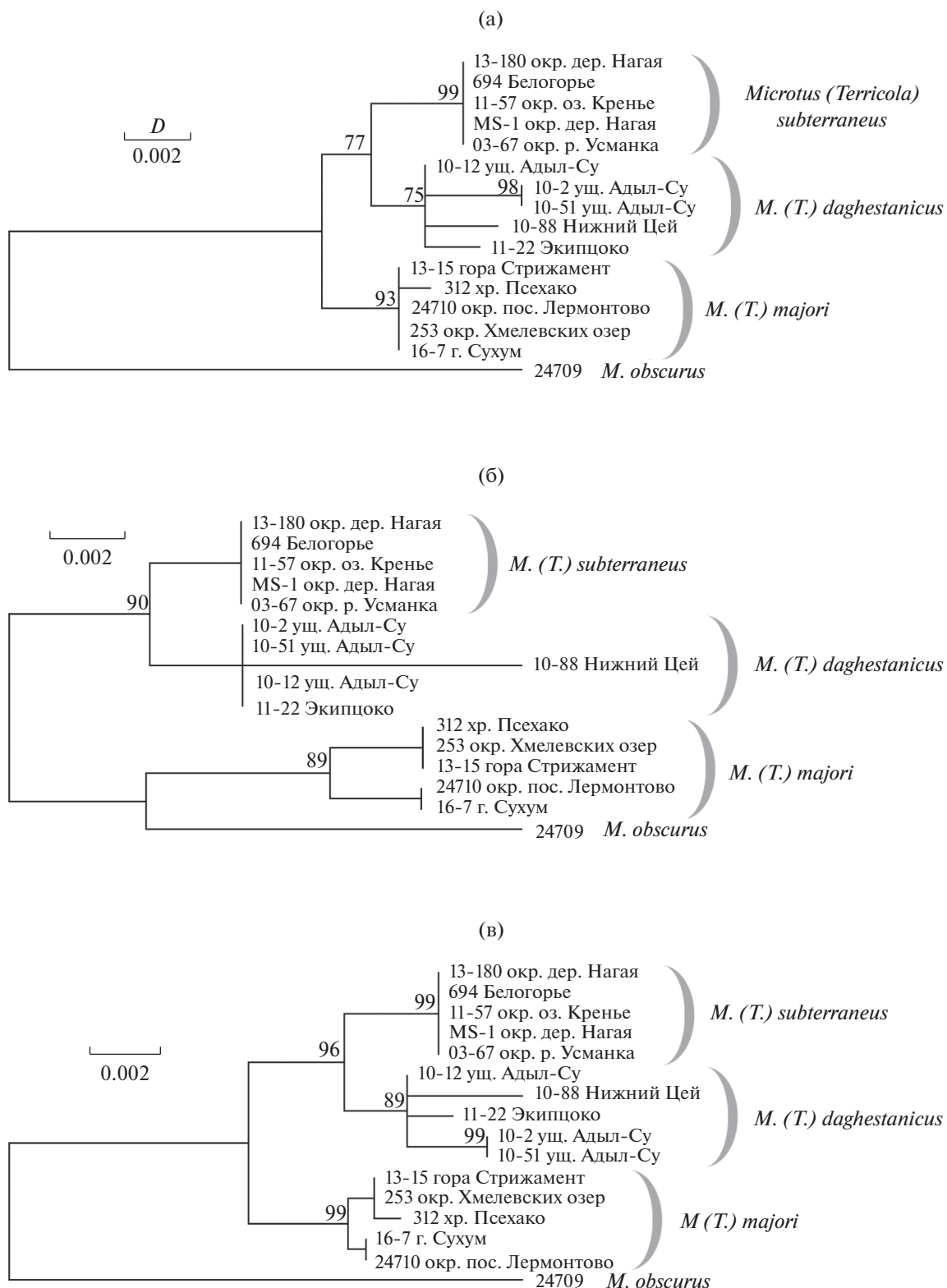
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

По обоим проанализированным последовательностям ядерной ДНК, даже по короткому фрагменту гена *XIST*, были выявлены видоспецифичные замены нуклеотидов и делеции/вставки, что обусловило распределение генотипов на дендрограммах в строгом соответствии с видовой принадлежностью полевок (рис. 1). Так, из 1473 нуклеотидов участка гена *BRCA1* каждая из 10 замен (6 транзиций и 4 трансверсий) была “фиксированной” у какого-либо одного из трех видов *Terricola*. Среди видов данного подрода *M. majori* наиболее обособленный и, возможно, самый древний: на дендрограмме, построенной по участку гена

*BRCA1*, кустарниковая полевка занимает базальное положение по отношению к *M. daghestanicus* и *M. subterraneus*, а на древе, построенном по гену *XIST*, даже является “сестринским” видом к *M. obscurus* (скорее всего, из-за короткого проанализированного фрагмента гена). Полученный результат согласуется с большинством предыдущих молекулярно-генетических (Jaarola *et al.*, 2004; Baskevich *et al.*, 2016, 2018; Баскевич и др., 2017) и аллозимных (Межжерин и др., 1995) исследований.

Изменчивость фрагментов обоих ядерных генов в пределах каждого из видов *Terricola* выражена в разной степени. Она крайне слабо проявляется у подземной полевки: между исследованными экземплярами *M. subterraneus*, несмотря на их принадлежность к разным хромосомным формам, практически нет различий. Столь же слабый полиморфизм наблюдается при сравнении особей *M. majori* по фрагменту экзона 11 гена *BRCA1*, однако по гену *XIST* и по объединенной последовательности обоих генов прослеживается дифференциация кустарниковых полевок с Северного Кавказа (из Ставропольского и Краснодарского краев) и из Закавказья (Армении и Абхазии), что согласуется с полученными ранее результатами анализа митохондриального гена *cytb* (Баскевич и др., 2017). Неожиданно высокой оказалась изменчивость ядерных генов у *M. daghestanicus*: максимальные генетические дистанции между отдельными экземплярами дагестанской полевки ( $D = 0-0.005$  по гену *BRCA1* и  $D = 0-0.007$  по гену *XIST*) сопоставимы с межвидовыми различиями ( $D = 0.006$  между всеми парами видов *Terricola* по гену *BRCA1* и  $D = 0.006-0.018$  по гену *XIST*). Примечательно, что если по гену *XIST* лишь одна особь *M. daghestanicus* значительно обособлена от прочих экземпляров этого же вида, то по гену *BRCA1* высокие различия наблюдаются между четырьмя из пяти исследованных дагестанских полевок, причем даже в пределах одного локалитета.

Полученные результаты позволяют предположить, что различия в характере внутривидовой дифференциации кавказских видов *M. daghestanicus* и *M. majori* связаны с их экологическими особенностями. Дагестанские полевки населяют субальпийский пояс гор Кавказа, что ведет к фрагментации поселений и быстрому накоплению и фиксации в них генетических различий. Однако при сдвигах лесного пояса ниже по склонам гор в неблагоприятные периоды (например, в ледниковые эпохи) контакты между изолированными прежде поселениями *M. daghestanicus* могли возобновляться, объединяя и “перемешивая” генетически отличающиеся популяции. В отличие от дагестанской полевки *M. majori* обитает в лесном горном поясе, и по долинам этот вид мог распространиться весьма широко. Серьезным барьером



**Рис. 1.** ML-дендрограммы, построенные при сравнении нуклеотидных последовательностей: а – фрагмента 11-го экзона ядерного гена *BRCA1* (1473 п.н.), б – фрагмента ядерного гена *XIST* (415 п.н. с учетом делеций и вставок), в – объединенных фрагментов обоих генов (1888 п.н. с учетом делеций и вставок) отдельных особей видов подрода *Terricola*. В узлах ветвления дендрограммы указаны значения бутстреп-индекса, превышающие 70%, а справа от ветвей – зоологические номера исследованных нами особей и пункты отлова. *D* – шкала генетических дистанций.

для него являются лишь высокие безлесные горные хребты, поэтому отчетливая генетическая обособленность разделенных Большим Кавказом популяционных группировок кустарниковой полевки представляется закономерной.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, впервые проведенный сравнительный анализ фрагментов двух ядерных генов у трех видов подрода *Terricola* подтвердил их значительную генетическую разобщенность и обособленное положение *M. majori* по отношению к *M. daghestanicus*–*M. subterraneus*. По гену *XIST* обнаружена слабая дифференциация кустарниковой полевки на северокавказскую и закавказскую популяционные группировки, а по фрагментам обоих ядерных генов – неожиданно высокая внутривидовая изменчивость *M. daghestanicus* вне отчетливой связи с географическим происхождением животных. Вероятнее всего, различия в характере внутривидового генетического полиморфизма у кустарниковой и дагестанской полевки обусловлены экологическими особенностями этих видов (обитанием *M. daghestanicus* в субальпийском горном поясе, а *M. majori* – в лесном).

Авторы признательны И.Ю. Баклушинской, Е.А. Шварцу, Е.М. Литвиновой, У.М. Ашибоккову, С.Ф. Сапельникову за помощь в сборе материала, а также Д.М. Щепетову и В.Г. Тамбовцевой за содействие при проведении молекулярно-генетического анализа.

Работа выполнена в рамках Государственных заданий № 0108-2019-0007 и № 0109-2018-0073.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ахвердян М.Р., Ляпунова Е.А., Воронцов Н.Н. Кариология и систематика кустарниковых полевки Кавказа и Закавказья (*Terricola*, Arvicolinae, Rodentia) // Зоол. журн. 1992. Т. 71. Вып. 3. С. 96–110.
- Баскевич М.И., Богданов А.С., Потапов С.Г., Хляп Л.А., Окулова Н.М. Конгруэнтность хромосомных и молекулярных данных в изучении межвидовой дифференциации и внутривидовой структуры кустарниковых полевки (*Terricola*, Arvicolinae, Rodentia) Кавказа и сопредельных территорий // Горные экосистемы и их компоненты: Матер. VI Всерос. конф. Махачкала: АЛЕФ, 2017. С. 128–129.
- Загороднюк И.В. Кариотип, систематическое положение и таксономический статус *Pitymys ukrainicus* (Rodentia) // Вестн. зоологии. 1988. № 4. С. 50–55.
- Межжерин С.В., Морозов-Леонов С.Ю., Кузнецова И.А. Биохимическая изменчивость и биохимическая дивергенция полевки Arvicolinae Палеарктики. Подземные полевки подрода *Terricola*, настоящие лемминги *Lemmus* Link, 1795, копытные лемминги *Dicrostonyx* Gloger, 1841, степные пеструшки *Lagurus* Gloger, 1842, слепушонки *Ellobius* Fischer von Waldheim, 1814 // Генетика. 1995. Т. 31. № 6. С. 788–797.
- Миронова Т.А., Сапельников С.Ф., Хляп Л.А., Окулова Н.М., Баскевич М.И. Сравнительные краниологические исследования полевки подрода *Terricola* (Rodentia, Arvicolinae, *Microtus*) фауны России // Зоол. журн. 2013. Т. 92. № 1. С. 87–98.
- Павлинов И.Я. Систематика современных млекопитающих. М.: Издательский Дом МГУ, 2003. 297 с.
- Хатухов А.М., Дзюев Р.И., Темботов А.К. Новые кариотипические формы кустарниковых полевки (*Pitymys*) Кавказа // Зоол. журн. 1978. Т. 57. № 10. С. 1566–1570.
- Baskevich M.I., Potapov S.G., Mironova T.A. Cryptic species of rodents as models in research on the problems of species and speciation // Biol. Bull. Rev. 2016. V. 6. № 3. P. 245–259.
- Baskevich M.I., Bogdanov A.S., Khlyap L.A., Schwartz Je.A., Litvinova E.M. Taxonomic interpretation of allopatric mammalian forms on the example of two karyomorphs of *Microtus (Terricola) subterraneus* (Rodentia, Arvicolinae) from Eastern Europe // Dokl. Biol. Sci. 2018. V. 480. P. 119–123.
- Chaline J., Brunet-Lecomte P., Graf J.D. Validation de *Terricola* Fatio, 1867 pour les compagnols souterrains (Arvicolidae, Rodentia) palearctiques actuels et fossiles // Comptes Rendus de l'Acad. Sci. (Paris). Ser. III. 1988. V. 306. P. 475–478.
- Jaarola M., Martinková N., Gündüz I., Brunhoff C., Zima J., Nadachowski A., Amori G., Bulatova N.S., Chondropoulos B., Fragedakis-Tsolis S., González-Esteban J., López-Fuster M.J., Kandaurov A.S., Kefelioğlu H., da Luz Mathias M., Villate I., Searle J.B. Molecular phylogeny of the speciose vole genus *Microtus* (Arvicolinae, Rodentia) inferred from mitochondrial DNA sequences // Mol. Phyl. Evol. 2004. V. 33. P. 647–663.
- Kratochvil I., Kral B. Karyotypes and relationship of Palearctic “54-chromosome *Pitymys* species” (Microtinae, Rodentia) // Zool. Listy. 1974. V. 23. P. 562–575.
- Macholan M., Filippucci M.G., Zima J. Genetic variation and zoogeography of pine voles of the *Microtus subterraneus/majori* group in Europe and Asia Minor // J. Zool. 2001. V. 255. P. 31–42.
- Musser G.G., Carleton M.D. Superfamily Muroidea // Mammal species of the world. A taxonomic and geographic reference / Eds Wilson D.E., Reeder D.M. 3 ed. Baltimore: The Johns Hopkins Univ. Press, 2005. P. 894–1531.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. 398 p.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. // Mol. Biol. Evol. 2013. V. 30. Iss. 12. P. 2725–2729.

**Differentiation and Phylogenetic Relationships of Three Pine Vole Species of the Subgenus *Terricola* (Rodentia, Arvicolinae, *Microtus*): Results of Analysis of *BRCA1* and *XIST* Nuclear Gene Fragments**

**A. S. Bogdanov<sup>1, #</sup>, L. A. Khlyap<sup>2</sup>, and M. I. Baskevich<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia*

<sup>2</sup>*Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Leninsky prosp. 33, Moscow, 119071 Russia*

<sup>#</sup>*e-mail: bogdalst@yahoo.com*

Variability of three pine vole species as well differences between them and phylogenetic relationships were firstly determined by analysis of nucleotide sequence fragments of nuclear genes *BRCA1*, exon 11 (1473 bp) and *XIST* (415 bp). Data, obtained by us, demonstrate significant genetic disunity of the species and *M. majori* apartness related to *M. daghestanicus*–*M. subterraneus*. Studying *XIST* gene revealed *M. majori* differentiation into close North Caucasian and Trans-Caucasian population groups. Fragments of both nuclear genes exhibited unexpectedly high intraspecific variability in *M. daghestanicus* out of clear relations with sample geographic origin. We propose that differences in genetic polymorphism character between *M. daghestanicus* and *M. majori* due to their ecological peculiarities.