

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
УРАЛЬСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ
ИНСТИТУТ ЭКОЛОГИИ РАСТЕНИЙ И ЖИВОТНЫХ

ЭКОЛОГИЯ: популяция, вид, среда

МАТЕРИАЛЫ ВСЕРОССИЙСКОЙ
КОНФЕРЕНЦИИ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ

14 – 18 апреля 2014 г.
ЕКАТЕРИНБУРГ

УДК 574 (061.3)

Э 40

*Материалы конференции изданы при финансовой поддержке
Президиума Уральского отделения РАН (проект № 14-4-МШ-32)
и Российского фонда фундаментальных исследований
(проект № 14-04-06811).*

Экология: популяция, вид, среда. Материалы конф. молодых ученых, 14 – 18 апреля 2014 г. / ИЭРиЖ УрО РАН – Екатеринбург: Гощицкий, 2014. – 176 с.

В сборнике опубликованы материалы Всероссийской конференции молодых ученых «Экология: популяция, вид, среда». Мероприятие проходило в Институте экологии растений и животных УрО РАН с 14 по 18 апреля 2014 г. Работы посвящены проблемам изучения биологического разнообразия на популяционном, видовом и экосистемном уровнях, анализу экологических закономерностей эволюции, поиску механизмов адаптации биологических систем к экстремальным условиям, а также популяционным аспектам экотоксикологии, радиобиологии и радиоэкологии.

ISBN 978-5-98829-047-6

© Авторы, 2014

© ИЭРиЖ УрО РАН, 2014

© Оформление. Издательство «Гощицкий», 2014

ИЗМЕНЧИВОСТЬ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК ОБЫКНОВЕННОЙ ПОЛЕВКИ *MICROTUS ARVALIS OBSCURUS* (ARVICOLINAE, RODENTIA): НОВЫЕ ДАННЫЕ

П.А. СИБИРЯКОВ

Институт экологии растений и животных УрО РАН, Екатеринбург

Ключевые слова: *Microtus arvalis obscurus*, митохондриальная ДНК, цитохром *b*, Урал.

Обыкновенная полевка — широко распространенный в Северной Евразии вид, часто используемый в качестве модельного объекта при проведении эволюционно-экологических исследований. Данный вид представлен двумя формами, имеющими спорный таксономический статус: *Microtus arvalis arvalis* и *M. arvalis obscurus*. На примере западной формы *M. arvalis arvalis* проведен ряд филогеографических исследований (Haynes et al., 2003; Tougaard et al., 2008, 2013; Renvoise et al., 2011; Martinkova et al., 2013) и показана внутренняя структура данной формы с выделением нескольких клад, история расселения которых согласуется с представлениями о климатических и ландшафтных изменениях в европейской части ареала вида на протяжении последних 500 тыс. лет (Tougaard et al., 2008).

Обитающая на востоке и занимающая примерно половину ареала форма *M. arvalis obscurus* изучена в меньшей степени. В частности, в базе данных GeneBank представлено более 500 последовательностей гена цитохрома *b* формы *M. arvalis arvalis*, при этом последовательностей формы *M. arvalis obscurus* всего 50.

Форма *obscurus* представлена двумя кладами: Южно-Кавказской (South Caucasian), которая занимает незначительную часть ареала в северо-восточной части Турции и закавказских республиках, и Китайско-Русской (Sino-Russian), широко распространенной на востоке видового ареала и, по данным последних исследований, не имеющей выраженной внутренней структуры по результатам анализа изменчивости гена цитохрома *b* (Tougaard et al., 2013).

Целью данной работы было получение новых данных по изменчивости митохондриальной ДНК *M. arvalis obscurus* из Уральского региона для оценки выраженности филогеографической структуры Китайско-Русской клады *M. arvalis obscurus*. Были поставлены следующие задачи: 1) отлов животных в Уральском регионе от северной границы ареала вида в регионе до степной зоны и от Вятско-Камского Предуралья до восточного склона Урала и сбор образцов, пригодных для выделения ДНК; 2) составление банка данных нуклеотидных

последовательностей гена цитохрома *b* *M. arvalis obscurus* из Уральского региона; 3) синтез оригинальных и литературных данных и проверка гипотезы об отсутствии филогеографической структуры в пределах распространения *M. arvalis obscurus* в Уральском регионе.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

При проведении отловов отобрано более 300 образцов мышечной ткани обыкновенной полевки из 20 локалитетов (в том числе в 14 локалитетах сбор образцов проведен при непосредственном участии автора) в пределах Уральского региона. Географически точки распределены в направлении запад – восток от Вятско-Камского Предуралья до восточного склона Урала и в направлении север – юг от северной границы ареала вида на Урале (г. Ивдель, Свердловская область) до степной зоны (п. Айтуар, Оренбургская область, граница с Казахстаном) (рис. 1).

Методики, основанные на ПЦР, использовались для решения двух задач: 1) предварительная видовая идентификация полевок – проанализированы 190 образцов, из которых на данный момент произведено выделение ДНК; 2) ПЦР для дальнейшего секвенирования последовательностей гена цитохрома *b* – получены данные для 49 образцов.

Выделение тотальной ДНК осуществляли из образцов мышечной ткани животных зафиксированных в 96%-ном этаноле методом солевой экстракции (Aljanabi, Martinez, 1997) с некоторыми модификациями (Ракитин и др., 2013). Видовую идентификацию проводили по методике, предложенной А. Некрутенко (Nekrutenko et al., 1999).

ПЦР участка митохондриальной ДНК, содержащего ген цитохрома *b*, осуществляли с использованием пары праймеров L7 (5' –ACCAATGACATGAAAAATCATCGTT– 3') и H6 (5' –TCTCCATTTCTGGTTTACAAGAC– 3') (Tougard et al., 2007) в 25 мкл реакционной смеси (dNTP's (SibEnzyme) 3 mM каждого, Taq Buffer 10x +KCl –MgCl₂ (Fermentas), 6.25 mM MgCl₂ (Fermentas), 7.5 pM каждого праймера, 2.5U Taq DNA Polymerase (SibEnzyme), 50–100 нг матрицы ДНК) по протоколу (94°C – 3'; [94°C – 20"; 58°C – 15"; 72°C – 1' 20"] – 35 циклов; 72°C – 10') на амплификаторе MyCycler (BioRad). Для очистки ПЦР продукта от примесей осуществляли электрофорез в 1%-ном агарозном геле, после чего участок геля, содержащий необходимый фрагмент, вырезали и переосаждали ПЦР продукт с использованием Silica (Sigma-Aldrich S-S5631). Секвенсовую ПЦР проводили с использованием набора реактивов «Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit» V. 3.1 (Applied Biosystems, USA) в соответствии с рекомендациями производителя. Секвенирование осуществляли на автоматическом секвенаторе ABI Prism 3130 (Applied Biosystems, USA).

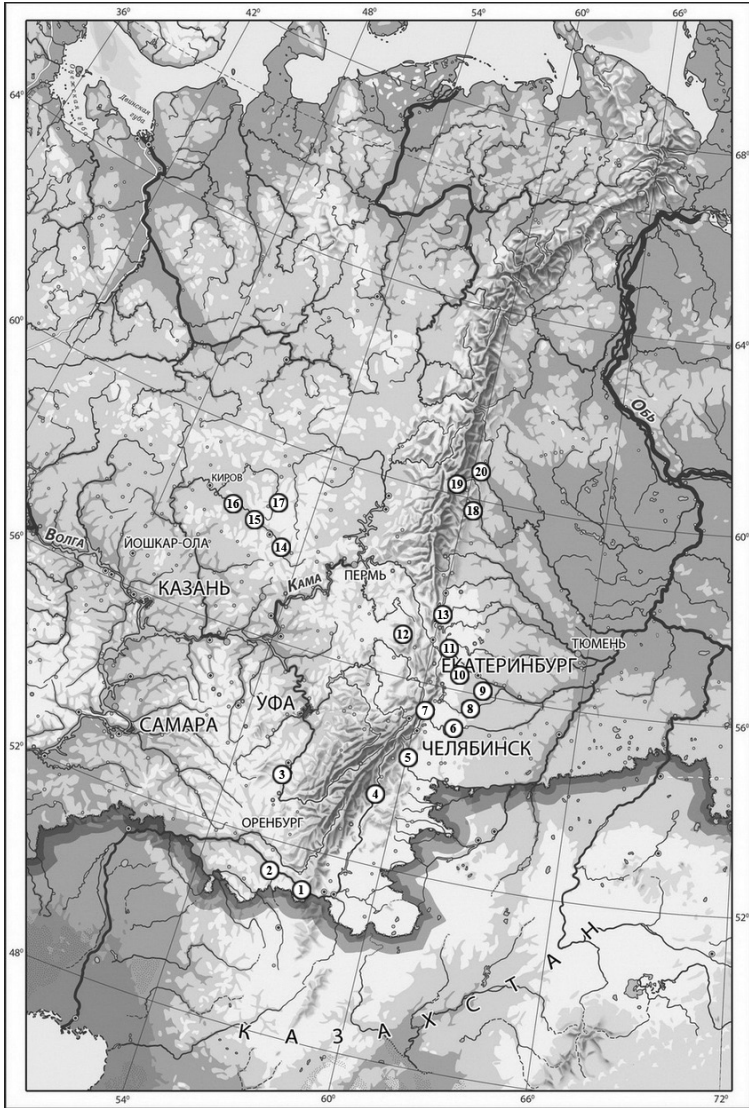


Рис. 1. Точки сбора материала: 1 – п. Айтуар; 2 – гора Верблюжка; 3 – г. Ишимбай; 4 – г. Магнитогорск; 5 – г. Озерск; 6 – г. Челябинск; 7 – Ильменский заповедник; 8 – головная часть ВУРСа; 9 – д. Старикова; 10 – Биостанция УрФУ; 11 – г. Екатеринбург; 12 – Нижнеиргинская дубрава; 13 – г. Нижний Тагил; 14 – д. Залазна; 15 – д. Черная Холуница; 16 – г. Белая Холуница; 17 – д. Зимино; 18 – п. Черемухово; 19 – д. Сосьва (Долгая Поберега); 20 – г. Ивдель (в точках 1–3, 7, 9, 10, 12, 14–20 сбор образцов производился при непосредственном участии автора).

Первичную обработку результатов секвенирования производили с использованием программы BioEdit v 7.2.0 (4.30.2013) (Hall, 1999). Все результаты автоматического анализа полученных данных капиллярного электрофореза были перепроверены вручную. В случае неудовлетворительного результата и наличии спорных участков и/или нуклеотидов в пределах последовательности было произведено повторное секвенирование данных образцов для устранения возникших разночтений. Для проведения дальнейшей обработки и последующих филогенетических реконструкций были использованы программы BioEdit v 7.2.0 (4.30.2013) (Hall, 1999), MEGA v6 (Tamura et al., 2013), MrBayes v 3.2.2 (Ronquist et al., 2012), Network v 4.6.1.2 (Bandelt et al., 1999), FigTree v1.4.0.

Для анализа были использованы оригинальные и литературные данные по изменчивости гена цитохрома *b* у 108 особей обыкновенной полевки. Литературные данные: 59 последовательностей гена цитохрома *b* обыкновенной полевки. Номера в базе данных GeneBank: AY220760–67; 70; 76; 77 [на рис. 2: Siberia A, B; Ukrain B; Russia C; Georgia; Armenia; Slovakia A; Finland; Denmark; Germany; Italy] (Hayens et al., 2003); AM991031; 59; 76; 78 [на рис. 2: MA10; 76; 118; 123] (Tougaard et al., 2008); FR865393–429 [на рис. 2: MO1–57] (Tougaard et al., 2013); KF839584–90 [на рис. 2: S01–03; 015–017; 152] (данные неопубликованного отчета Б. Жумабековой и др. по современному состоянию ГПЗ «Пойма реки Иртыш», Казахстан). Оригинальные данные: 49 последовательностей гена цитохрома *b* обыкновенной полевки формы *obscurus* из Уральского региона и 3 последовательности гена цитохрома *b* восточноевропейской полевки *M. rossiaemeridionalis* (использованных в качестве внешней группы). Номера оригинальных образцов на рис. 2 промаркированы префиксами «М» и «Мк» в соответствии с нумерацией образцов в коллекции лаборатории филогенетики и биохронологии ИЭРиЖ УрО РАН.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе анализа оригинальных и литературных данных установлено, что из 99 последовательностей гена цитохрома *b* обыкновенной полевки формы *obscurus* 91 последовательность из 29 точек относится к кладе Sino-Russian (рис. 2, 3), среди них встречено 57 уникальных гаплотипов гена цитохрома *b*, 24 из которых впервые описаны в ходе выполнения данной работы.

Анализ филогенетического дерева (см. рис. 2), построенного с использованием алгоритма Байесова анализа (программа MrBayes), и медианной сети (рис. 4) показал, что различия в пределах клады Sino-Russian незначительны по сравнению с различиями между кладами, относящимися к форме *obscurus* (Sino-Russian и South

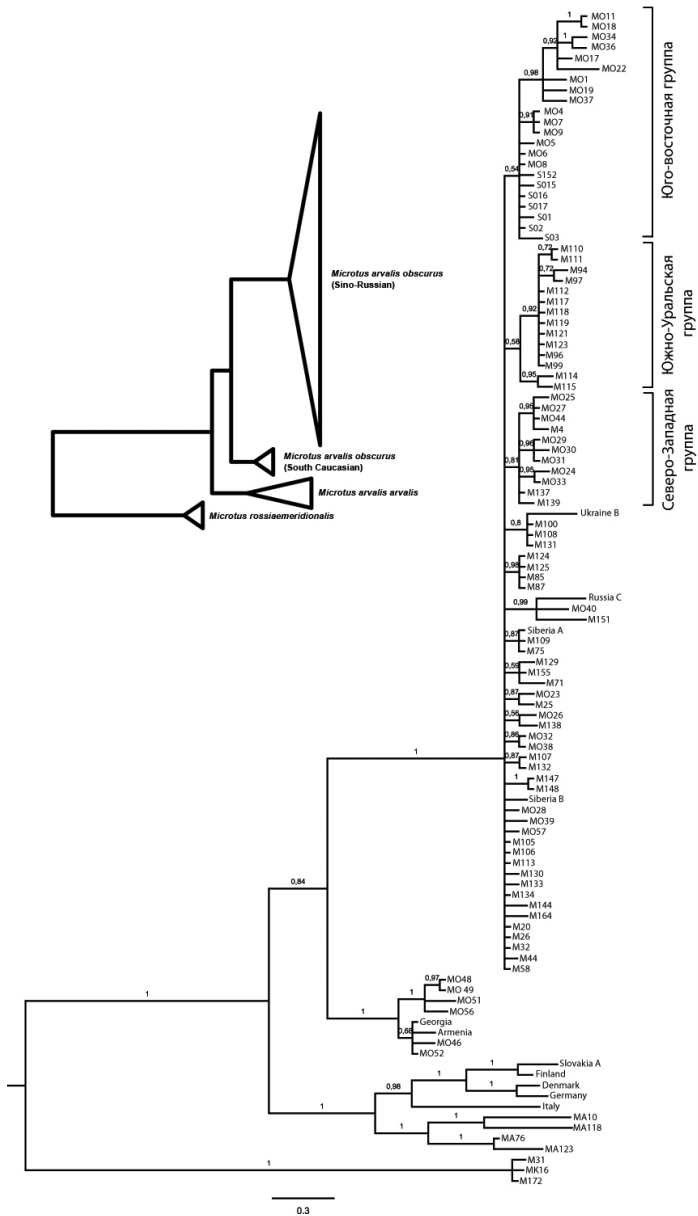


Рис. 2. Реконструкция филогенетического дерева на основании анализа изменчивости гена цитохрома *b* *M. arvalis obscurus* (наименование образцов и их принадлежность обозначены в тексте, цифры над ветвями – итоговые значения вероятностей Байесова анализа).

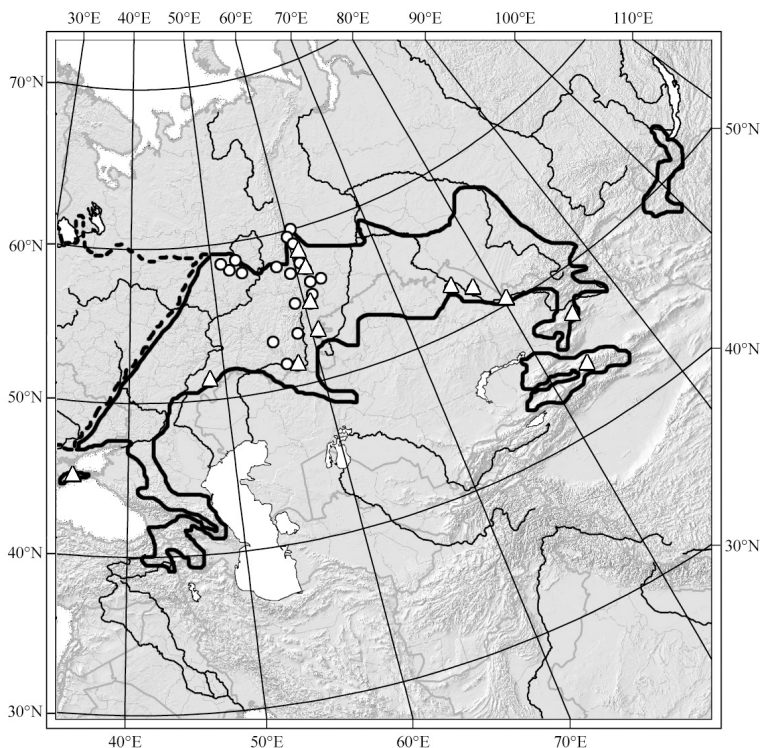


Рис. 3. Географическое расположение точек отлова *M. arvalis obscurus*, последовательности гена цитохрома *b* которых отнесены к кладе Sino-Russian. \circ – оригинальные данные; Δ – данные получены из БД GeneBank (Hayens et al., 2003; Tougard et al., 2013).

Caucasian). Дальнейший анализ структуры клады Sino-Russian позволяет предположить наличие трех групп родственных гаплотипов, кластеризующихся при построении филогенетического дерева (см. рис. 2) с относительно высоким уровнем статистической поддержки. Данные группы имеют достаточно четкую географическую локализацию: 1) юго-восточная группа, наиболее дифференцированная группа гаплотипов, занимающая юго-восточную часть ареала клады – северо-восток Казахстана и северо-запад Китая; 2) южно-уральская группа – группа гаплотипов, локализованная на Южном Урале; 3) северо-западная группа – гаплотипы, обнаруженные в Кировской области. Большая часть гаплотипов, не включенных в данные группы, встречаются вдоль Уральского хребта и относительно слабо дифференцированы между собой.

Из анализа медианной сети (см. рис. 4), отражающей взаимоотношения гаплотипов между собой, видно, что все три внутренние группы клады, описанные при анализе филогенетического дерева, образуют относительно самостоятельные группировки и на медианной сети. Также можно выделить звездчатую структуру, находящуюся в центре сети клады Sino-Russian, включающую слабо дифференцированные гаплотипы из Уральских популяций, не образовавшие при построении филогенетического дерева (см. рис. 2) единой группы. Подобная картина характерна для группировок, в недавнем прошлом начавших активно заселять новую территорию (Abramson et al., 2012).

Для более подробного описания филогенетической структуры, а также истории расселения как клады Sino-Russian, так и формы *M. arvalis obscurus* в целом в дальнейшем предполагается расширение выборки за счет включения в анализ образцов из большего числа точек в пределах всего ареала данной формы обыкновенной полевки и данных по изменчивости других маркеров митохондриальной ДНК.

Таким образом, начато создание банка данных нуклеотидных последовательностей гена цитохрома *b* *M. arvalis obscurus* из Уральского региона, который на данный момент включает в себя данные о 49 последовательностях, среди которых встречены 27 уникальных гаплотипов.

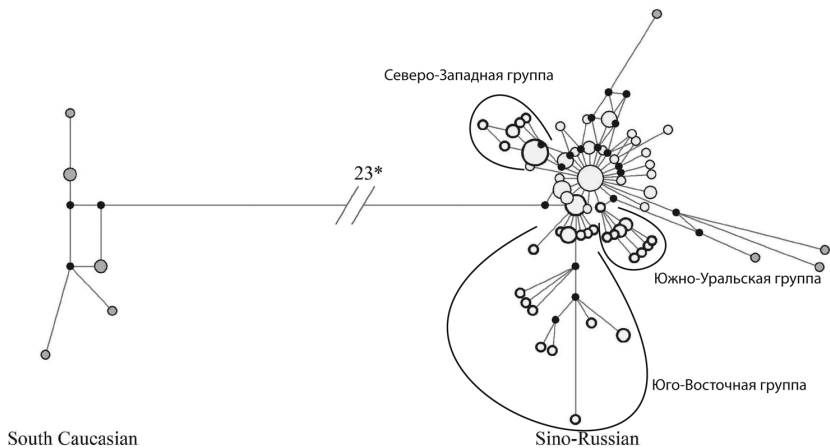


Рис. 4. Медианная сеть гаплотипов гена цитохрома *b* *M. arvalis obscurus*. Сеть построена по алгоритму Median joining с использованием программы Network v. 4.6.1.2. Размер узлов сети эквивалентен числу идентичных последовательностей, включенных в данный узел, длина ветвей эквивалентна числу замен. Узлы, обозначенные черным цветом, – медианные векторы.

Синтез оригинальных и литературных данных для проверки гипотезы об отсутствии филогеографической структуры в пределах распространения клады Sino-Russian *M. arvalis obscurus* показал, что использование в качестве маркера гена цитохрома *b* позволяет предположить в пределах клады наличие как минимум трех географически локализованных групп родственных гаплотипов.

Анализ изменчивости последовательностей гена цитохрома *b* у животных из уральских популяций свидетельствует, видимо, об относительно недавнем и быстром расселении данного вида по территории Урала.

Автор выражает благодарность Е.А. Марковой, С.Б. Ракитину, В.Л. Семерикову, Ю.Я. Хрунык и сотрудникам лаборатории филогенетики и биохронологии ИЭРиЖ УрО РАН за помощь на разных этапах выполнения работы.

Работа выполнена при поддержке Президиума УрО РАН (проект № 14-4-ИП-60), РФФИ (проект № 14-04-00614) и ФЦП поддержки ведущих научных школ (НШ-2840.2014.4).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ракитин С.Б., Копориков А.Р., Богданов В.Д. и др. Изменчивость микросателлитной ДНК налима (*Lota lota*) Обь-Иртышского бассейна: тестирование праймеров и оптимизация методики // Вестн. Астраханского гос. технич. ун-та. Серия: рыбное хозяйство. 2013. № 3. С. 118–128.
- Abramson N.I., Petrova T.V., Dokuchaev N.E. et al. Phylogeography of the gray red-backed vole *Craseomys rufocanus* (Rodentia: Cricetidae) across the distribution range inferred from nonrecombining molecular markers // Rus. J. of Theriology. 2012. V. 11. P. 137–156.
- Aljanabi S.M., Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques // Nucleic Acids Research. 1997. V. 25. № 22. P. 4692–4693.
- Bandelt H.-J., Forster P., Röhl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies // Mol. Biol. Evol. 1999. V. 16. P. 37–48.
- Hall T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT // Nucl. Acids. Symp. 1999. V. 41. P. 95–98.
- Haynes S., Jaarola M., Searle J.B. Phylogeography of the common vole (*Microtus arvalis*) with particular emphasis on the colonization of the Orkney archipelago // Mol. Ecol. 2003. V. 12. № 4. P. 951–956.
- Marínková N., Barnett R., Cucchi T. et al. Divergent evolutionary processes associated with colonization of offshore islands // Mol. Ecol. 2013. V. 22. № 20. P. 5205–5220.
- Nekrutenko A., Makova K.D., Chesser R.K., Baker R.J. Representational difference analysis to distinguish cryptic species // Mol. Ecol. 1999. V. 8. № 7. P. 1235–1237.
- Renvoise E., Montuire S., Richard Y. et al. Microevolutionary relationships between phylogeographical history, climate change and morphological

- variability in the common vole (*Microtus arvalis*) across France // J. of Biogeography. 2012. V. 39. № 4. P. 698–712.
- Ronquist F., Teslenko M., van der Mark P. et al. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space // Systematic biology. 2012. V. 61. № 3. P. 539–542.
- Shenbrot G.I., Krasnov B.R. An atlas of the geographic distribution of the arvicoline rodents of the world (Rodentia, Muridae: Arvicolinae). Sofia: Pensoft Publ., 2005. 350 p.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D. et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. // Molecular Biology and Evolution. 2013. V. 30. P. 2725–2729.
- Tougaard C., Brunet-Lecomte P., Fabre M., Montuire S. Evolutionary history of two allopatric *Terricola* species (Arvicolinae, Rodentia) from molecular, morphological, and palaeontological data // Biol. J. of the Linnean Society. 2007. V. 93. P. 309–323.
- Tougaard C., Renvoise E., Petitjean A., Quere J-P. New Insight into the Colonization Process of Common Voles: Inferences from Molecular and Fossil Evidence // PLoS ONE. 2008. V. 3. P. 3532.
- Tougaard C., Montuire S., Volobouev V. et al. Exploring phylogeography and species limits in the Altai vole (Rodentia: Cricetidae) // Biol. J. of the Linnean Society. 2013. V. 108. P. 434–452.