

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ И ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ МАЛЫХ ОСТРОВНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ ДАЛЬНЕВОСТОЧНОЙ ПОЛЕВКИ *MICROTUS FORTIS* BÜCHNER, 1889 (RODENTIA, CRICETIDAE)

В. Ю. Гуськов, И. Н. Шереметьева

Микроэволюция – это начальная стадия эволюционных процессов, протекающих в популяциях и приводящих к образованию новых популяций либо подвидов и заканчивающаяся образованием новых видов. Раскрытие механизмов микроэволюционного процесса является одной из фундаментальных задач биологии (Шварц, 1980; Тимофеев-Ресовский и др., 1973). Основу биологической концепции вида составляет критерий репродуктивной изоляции (Майр, 1947, 1968; Тимофеев-Ресовский и др., 1969; Воронцов, 1999), выявить которую, порой, очень трудно. Зоологи на практике чаще по-прежнему руководствуются морфологическими критериями разделения или объединения видов, но развитие цитогенетики, биохимии, молекулярной генетики привело к введению в классическую систематику комплекса новых методов, которые могут предоставить дополнительные критерии разграничения форм. В свете политипической концепции вида (Семенов-Тянь-Шанский, 1910; Шварц, 1969; Воронцов, 2004) и теории географического видообразования (Майр, 1947, 1968, 1974) значительный теоретический интерес представляют изолированные популяции широкоареальных видов. Проблемам изучения островных популяций уделяется особое внимание, так как условия длительной географической и генетической изоляции способствуют образованию уникальных наборов подвидов и видов.

Одной из наиболее удачных моделей для изучения закономерностей эволюционных процессов являются мелкие млекопитающие, в особенности грызуны, благодаря широкому распространению, разнообразию форм, короткому репродуктивному циклу и большой интенсивности размножения.

Дальневосточная полевка *Microtus fortis* Büchner, 1889 – политипический вид, распространенный на обширной территории Китая, Кореи и Монголии. В нашей стране ареал этого вида охватывает Западное и Восточное Забайкалье, Приморский край и южные районы Хабаровского края, Амурской области и север Сахалина. Несмотря на такое широкое распространение, популяции имеют мозаичное распределение по ареалу. На периферии ареала имеется ряд изолятов: на острове Сахалин и островах залива Петра Великого. На островах залива дальневосточная полевка является самым распространенным видом, она зарегистрирована на всех островах за исключением островов Стенина (Чугунов, Катин, 1984; Катин, 1989), Верховского и Аскольд (Шереметьев, 2001). На всех островах обитает одна подвидовая форма дальневосточной полевки – *Microtus fortis pelliceus* Thomas, 1911. Примечательно, что популяции данного вида способны существовать даже на очень мелких островах, поскольку обладают внутренними механизмами регуляции плотности населения (Катин, 1989).

Благодаря большому количеству, разнообразию и недавнему времени отделения от материка, острова залива Петра Великого являются удобной моделью для изучения особенностей начальных этапов микроэволюционных процессов в малых изолированных популяциях млекопитающих, в том числе и грызунов. В связи с полной изоляцией островов от материка и друг от друга, разной площадью островов и различными экологическими условиями, каждая островная популяция эволюционировала независимо, что привело к уникальности населения каждого острова.

Целью настоящей работы является изучение специфики изменчивости дальневосточной полевки *Microtus fortis* в малых островных популяциях юга Дальнего Востока и оценка уровня генетической дифференциации между островными и материковыми популяциями этого вида на основе анализа полиморфизма контрольного региона митохондриальной ДНК (мтДНК).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В настоящей работе проведен анализ изменчивости полного контрольного региона мтДНК 37 экземпляров дальневосточной полевки 11 островных популяций (острова Русский, Путятина, Попова, Клыкова, Рейнеке, Большой Пелис, Рикорда, Матвеева, Фуругельма, Лисий и Сахалин) и 3 материковых (окрестности г. Комсомольск-на-Амуре, г. Находка и пос. Хасан) популяций (рис. 1). Все исследованные особи относились к одному подвиду – *M. fortis pelliceus*. Также в анализ включены 22 последовательности контрольного региона мтДНК дальневосточной полевки (табл. 1), полученные Э. Харинг (Haring et al., 2011) и помещенные в GenBank/NCBI (№ NM135815 – NM135817, NM135819, NM135820, NM135823, NM135824, NM135826, NM135827, NM135831, NM135834 – NM135845). При построении филогенетических деревьев в качестве внешней группы были использованы последовательности гомологичного участка мтДНК полевки-экономки – *Microtus oeconomus* (Pallas, 1776), хранящиеся в базе данных GenBank/NCBI под номером NM135932 (Haring et al., 2011).

Выделение ДНК осуществляли с использованием стандартного метода экстракции фенол-хлороформом (Маниатис и др., 1984) из свежих или фиксированных 95 % спиртом тканей печени и мышц. Фрагмент контрольного региона был амплифицирован методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием прямого Pro+ (5' - ACC ATC AGC ACC CAA AGC TG -3') и обратного Phe- (5' - AAG CAT TTT CAG TGC TTT GCT T - 3') праймеров. Амплификацию проводили на приборе UNOII – Thermoblock ("Biometra", Германия) в 25 мкл реакционной смеси, включавшей 1-2 мкг тотальной ДНК, 2,5 мкл 10× буфера ("СибЭнзим", г. Новосибирск), 1 мкл 20 мМ смеси dNTP, 0,5 мкл каждого праймера, 3 ед. Таq-полимеразы ("СибЭнзим", г. Новосибирск) и деионизированную воду. ПЦР-реакцию проводили по следующей схеме: начальная денатурация ДНК (94 °С – 120 сек.), 40 циклов амплификации (94 °С – 10 сек., 52 °С – 10 сек., 72 °С – 60 сек.) и достройка цепей (72 °С – 420 сек.). Продукты амплификации подвергали циклическому секвенированию с помощью набора Big Dye Terminator версия 3.1 ("Applied Biosystems", США), с использованием прямого праймера (Pro+) в одной реакции и обратного праймера (Phe-) в другой при следующих условиях: начальная денатурация ДНК (96 °С – 60 сек), 25 циклов амплификации (96 °С – 30 сек, 50 °С – 10 сек, 60 °С – 240 сек). Последовательности нуклеотидов определяли на автоматическом секвенаторе ABI Prizm 3130 ("Applied Biosystems", США) Биолого-почвенного института ДВО РАН (г. Владивосток).

При анализе данных редактирование и выравнивание полученных последовательностей проводили с использованием программы BioEdit 7.0.9.0 (Hall, 1999).

Филогенетические реконструкции были выполнены с использованием следующих методических подходов: "ближайшего соседа" (NJ) и "максимального правдоподобия" (ML). Расчеты и построение NJ и ML деревьев выполнены с помощью программы MEGA 3.1 (Kumar et al., 2004) на основе модели Кимуры (K2P) с учетом и транзиций, и трансверсий и независимо от положения нуклеотида. Устойчивость порядка кластеризации оценивалась с помощью бутстрэп-анализа (1000 повторностей). Гаплотипическое (h) и нуклеотидное разнообразие (π) рассчитывали по программе ProSeq 2.9.1 (Filatov, 2002).

Таблица 1

Географическое положение и характеристики островов и материковых территорий,
и объем исследованных выборок *Microtus fortis pelliceus*

Код	Локалитет	Географические координаты	n	n*	S(км ²)	Время изоляции островов (тыс. лет)
Острова залива Петра Великого						
<i>Северо-восточная группа</i>						
Put	Приморский край, о. Путятина	42°50'с.ш.132°25'в.д.	3	1	22,68	9
Lis	Приморский край, о. Лисий	42°45'с.ш.132°54'в.д.	2	1	0,5	8
<i>Архипелаг Императрицы Евгении</i>						
Rus	Приморский край, о. Русский	43°00'с.ш.131°50'в.д.	1	0	93	8
Pop	Приморский край, о. Попова	42°57'с.ш.131°43'в.д.	2	1	12	8
Re	Приморский край, о. Рейнеке	42°54'с.ш.131°43'в.д.	1	1	6	8
Kl	Приморский край, о. Клыккова	42°55'с.ш.131°47'в.д.	2	1	0,2	8
Ri	Приморский край, о. Рикорда	42°52'с.ш.131°39'в.д.	3	1	5	8
<i>Дальневосточный государственный морской заповедник</i>						
Fur	Приморский край, о. Фуругельма	42°27'с. ш. 130°55'в. д.	2	0	1,9	8
<i>Архипелаг Римского-Корсакова</i>						
Mat	Приморский край, о. Матвеева	42°40'с.ш.131°25'в.д.	5	3	0,92	10
BP	Приморский край, о. Большой Пелис	42°39'с.ш.131°27'в.д.	4	0	3,28	10
Остров Сахалин						
Sak	Залив Байкал	53°34'с.ш.142°35'в.д.	3	0	76400	7
Материк						
Kha	Приморский край, пос. Хасан	42°25'с.ш.130°38'в.д.	3	3		
Nax	Приморский край, г. Находка	42°49'с.ш.132°52'в.д.	3	1		
Uss	Приморский край, г. Уссурийск	43°48'с. ш. 131°57' в. д.	0	1		
KP	Приморский край, Карантинная Падь	44°24'с. ш. 131°22' в. д.	0	1		
AM	Хабаровский край, г. Комсомольск-на-Амуре	50°33'с.ш.137°00'в.д.	3	2		
Sus	Хабаровский край, с. Сусанино	53°47'с.ш. 140°04'в.д.	0	2		
Uda	Хабаровский край, р. Уда	54°44'с. ш. 135°18' в. д.	0	2		
Mar	Хабаровский край, с. Мариинское	51°43'с.ш. 140°11'в.д.	0	1		

Примечание. n – количество наших образцов, n* – последовательности, полученные из Генбанка.

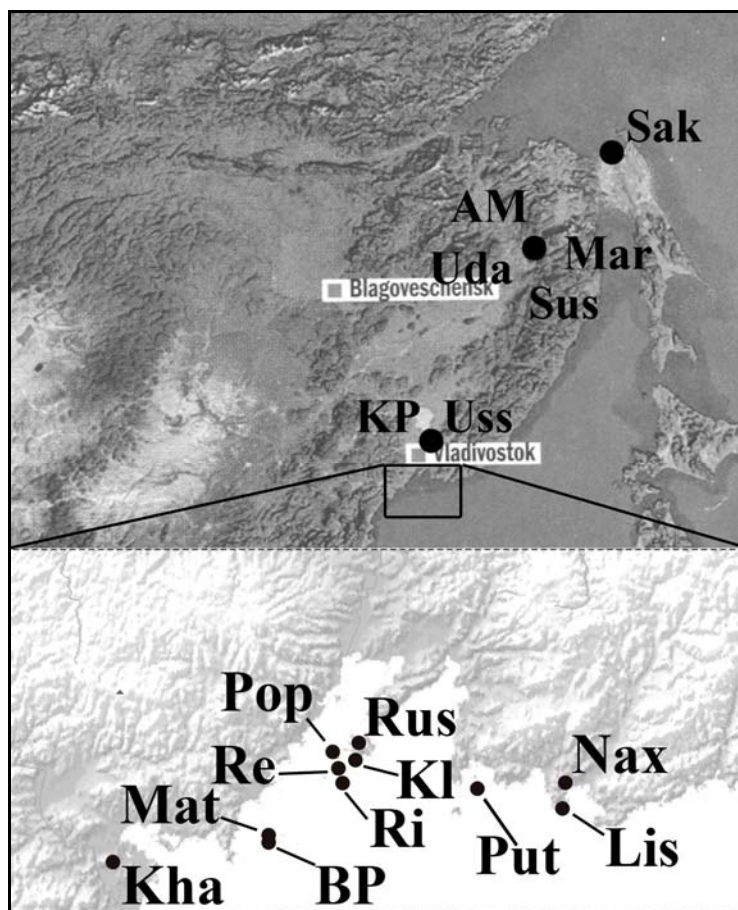


Рис. 1. Места сбора материала дальневосточной полевки *Microtus fortis*. Код локалитета см. в таблице.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для всех исследованных 59 экземпляров дальневосточной полевки были получены нуклеотидные последовательности контрольного региона мтДНК длиной 908 пн. Полученные последовательности мтДНК содержали 88 переменных сайтов, среди которых 52 были информативны. У полевок островных популяций было обнаружено 68 переменных сайтов, а у материковых – 36. Всего было найдено 36 гаплотипов, из них 11 были обнаружены в двух образцах, один – в трех, один – в пяти, два – в четырех, а остальные 21 были уникальны. В островных популяциях отмечено 29 гаплотипов, а в материковых 14. В целом для дальневосточной полевки отмечено низкое нуклеотидное ($0,01 \pm 0,01$) разнообразие и высокое гаплотипическое ($0,949 \pm 0,019$) разнообразие. Для всех островов нуклеотидное разнообразие было ($0,011 \pm 0,009$), а гаплотипическое ($0,97 \pm 0,016$). Для материка ($0,007 \pm 0,005$) и ($0,861 \pm 0,064$), соответственно. Внутригрупповая р-дистанция для вида в целом составляет $0,01 \pm 0,002$, для островов – $0,011 \pm 0,002$, а для материка – $0,007 \pm 0,001$.

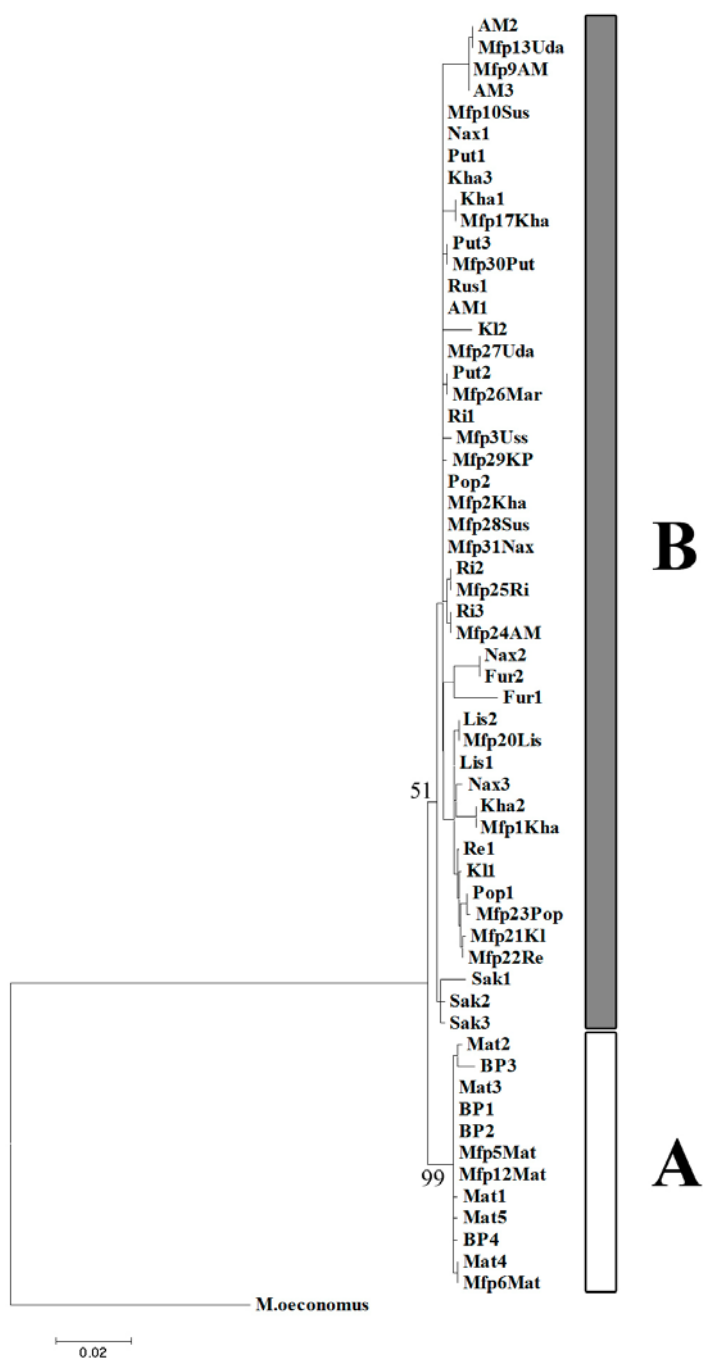


Рис. 2. NJ филогенетическое дерево гаплотипов дальневосточной полевки, полученное на основе анализа контрольного региона мтДНК. В узлах ветвления указаны бутстреп-значения. А – филогруппа полевок островов Большой Пелис и Матвеева; В – филогруппа полевок Хабаровского и Приморского краев, включая острова залива Петра Великого о. Большой Пелис и о. Матвеева.

Реконструкция филогенетических отношений между гаплотипами исследованных *M. fortis*, построенные различными методами, привели к идентичной топологии дерева. Все гаплотипы разделялись на две группы: первая группа (А филогруппа) включает гаплотипы только особей двух островных популяций – Большого Пелиса и Матвеева; вторая – (В филогруппа) всех остальных особей дальневосточной полевки (рис. 2). Генетическая дистанция между филогруппами А и В равна $0,016 \pm 0,004$, а внутри групп $0,002 \pm 0,001$ и $0,007 \pm 0,001$, соответственно. Эти группы различаются по 9 нуклеотидными заменам.

Таким образом, в результате анализа контрольного региона митохондриальной ДНК дальневосточной полевки было отмечено низкое нуклеотидное разнообразие при высоком гаплотипическом, что косвенно указывает на относительно недавнее время заселения исследуемой территории. В целом уровень генетической изменчивости для вида невысок. Генетическое разнообразие дальневосточной полевки в полной мере представлено как на островах, так и на материке. Этот результат можно объяснить эффектом кратковременного, в масштабах эволюции, отделения островов от материка, когда естественный отбор в полной мере проявиться еще не успел. Тем не менее, генетическая дифференциация островных и материковых популяций уже началась, о чем свидетельствует филогенетический анализ.

Размер популяции является одним из главных факторов, определяющих скорость и характер эволюции (Симпсон, 1948). Определить фактический размер популяции на материковых территориях очень трудно, но для островных популяций он, в большинстве случаев, прямо пропорционален размеру острова и площади биотопов, пригодных для обитания (MacArthur, Wilson, 1967). В заливе Петра Великого остров Матвеева – самый мелкий из исследованных нами островов ($S = 0,92 \text{ км}^2$), остров Большой Пелис – несколько крупнее (табл. 1), однако имеет мало пригодных для обитания дальневосточной полевкой мест в связи со сложностью рельефа. Таким образом, популяция дальневосточной полевки на этих островах обитает в пессимальных условиях по сравнению с близлежащими материковыми. В связи с этим для нее характерны значительные колебания численности (Чугунов, Катин, 1984; Катин, 1989). Благодаря внутренним механизмам регуляции плотности населения, популяции полевки могут существовать даже на очень мелких островах, не достигая при этом катастрофического уровня численности (Катин, 1989). Видимо, эта особенность имеет глубокие эволюционные корни, так как она характерна и для других видов рода *Microtus* (Lomolino, 1986).

Согласно палеонтологическим данным, в начале голоцена (10,5-10,2 тыс. лет назад) отмечалось интенсивное потепление. Это привело к увеличению доли широколиственных пород в составе растительности на юге Дальнего Востока (Короткий и др., 1988) и развитию остепнения и луговой растительности на низких уровнях рельефа на юге Приморского края (Короткий и др., 1996). В свою очередь, на этот же период приходится и время последней связи островов залива Петра Великого с материком (Короткий и др., 1988). Так, время изоляции этих островов оценивается примерно в 7-11 тыс. лет (Велижанин, 1976), при этом остров Большой Пелис в составе единого блока с соседними островами Матвеева отделился от материка одним из первых (около 10 тыс. лет назад). Не исключено, что дальневосточная полевка заселила прибрежные, еще не полностью изолированные районы суши, занимавшей в позднеледниковье по данным палеогеографов (Короткий и др., 1988, 1996) всю шельфовую ступень Японского моря. В этот период на месте нынешнего залива Петра Великого располагалась низменная равнина, обрамленная отдельными элементами

возвышенного рельефа, а современные очертания береговой линии сформировались только в оптимум голоцена примерно 6 тыс. лет назад (Короткий и др., 1996). Таким образом, можно предположить, что при формировании уникального генетического облика популяции дальневосточной полевки островов Большой Пелис и Матвеева, наряду с более ранним отделением их от материка, важную роль могли играть эффекты основателя и «бутылочного горлышка».

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаем благодарность сотрудникам лаборатории эволюционной зоологии и генетики Биолого-почвенного института ДВО РАН И.В. Картавцевой, М.В. Павленко, В.П. Короблеву, Л.В. Фрисман, К.В. Коробициной, сотрудникам лаборатории териологии М.П. Тиуну и И.С. Шереметьеву, а также сотруднику лаборатории орнитологии И.М. Тиуну за любезно предоставленный материал. Работа выполнена при поддержке грантов ДВО № 12-П-0-06-018, 12-И-ОБН-01 и 12-И-П6-02.

Литература

- Воронцов Н.Н. 1999.** Развитие эволюционных идей в биологии. М.: УНЦ ДО МГУ. 640 с.
- Воронцов Н.Н. 2004.** Развитие эволюционных идей в биологии. Второе издание. М. 432 с.
- Велижанин А.Г. 1976.** Время изоляции материковых островов северной части Тихого океана // Доклады АН СССР. Т. 231, № 1. С. 205–207.
- Катин И.О. 1989.** Динамика популяций дальневосточной полевки в условиях островной изоляции // Териологические исследования на юге Дальнего Востока. Владивосток: ДВО АН СССР. С. 89–99.
- Короткий А.М., Гребенникова Т.А., Пушкар В.С. 1996.** Климатические смены на территории юга Дальнего Востока в позднем кайнозое (миоцен-плейстоцен). Владивосток. 56 с.
- Короткий А.М., Плетнев С.П., Пушкар В.С. 1988.** Развитие природной среды юга Дальнего Востока (поздний плейстоцен – голоцен). М.: Наука. 240 с.
- Майр Е. 1947.** Систематика и происхождение видов с точки зрения зоолога. М.: Гос. изд-во иностранной литературы. 504 с.
- Майр Е. 1968.** Зоологический вид и эволюция. М.: Мир. 597 с.
- Майр Е. 1974.** Популяция, виды и эволюция. М.: Мир. 460 с.
- Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. 1984.** Молекулярное клонирование. М.: Мир. 474 с.
- Семенов-Тянь-Шанский А.П. 1910.** Таксономические границы вида и его подразделений: опыт точной категоризации низших систематических единиц // Зап. Импер. Акад. наук, физ.-мат. отд., сер. 8. Т. 25, № 1. С. 1–29.
- Симпсон Д.Г. 1948.** Темпы и формы эволюции. М.: Гос. изд-во иностранной литературы. 358 с.
- Тимофеев-Ресовский Н.В., Воронцов Н.Н., Яблоков А.В. 1969.** Краткий очерк теории эволюции. М.: Наука. 407 с.
- Тимофеев-Ресовский Н.В., Яблоков А.В. 1973.** Фены, фенетика и эволюционная биология // Природа. № 5. С. 40–51.
- Чугунов Ю.Д., Катин И.О. 1984.** Численность и распределение по биотопам грызунов на островах Дальневосточного государственного морского заповедника // Животный мир Дальневосточного морского заповедника. Владивосток: ДВНЦ АН СССР. С. 107–121.
- Шварц С.С. 1969.** Эволюционная экология животных: (экологические механизмы эволюционного процесса). Свердловск. 169 с.
- Шварц С.С. 1980.** Экологические закономерности эволюции. М.: Наука. 277 с.
- Шереметьев И.С. 2001.** Формирование наземной териофауны островов залива Петра Великого (Японское море) // Вестник ДВО РАН. № 4. С. 11–22
- Filatov D.A. 2002.** ProSeq: A software for preparation and evolutionary analysis of DNA sequence data sets // Molecular Ecology Notes. Vol. 2. P. 621–624.

- Hall T.A. 1999.** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT // Nucl. Acids. Symp. Ser. Vol. 41. P. 95–98.
- Haring E., Sheremetyeva I.N., Kryukov A.P. 2011.** Phylogeny of Palearctic vole species (genus *Microtus*, Rodentia) based on mitochondrial sequences // Mammalian Biology. Vol. 76. P. 258–267.
- Kumar S., Tamura K., Nei M. 2004.** MEGA3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment // Briefings in Bioinformatics. Vol. 5. P. 150–163.
- Lomolino M.V. 1986.** Mammalian community structure on islands: the importance of immigration, extinction and interactive effects // Biol. J. of the Linn. Soc. Vol. 28. P. 1–21.
- MacArthur R.H., Wilson E.O. 1967.** The theory of island biogeography. Princeton Univ. Press. 203 p.

**GENETIC VARIABILITY AND DIFFERENTIATION IN SMALL ISLAND
POPULATIONS OF FAR EASTERN VOLE *MICROTUS FORTIS* BÜCHNER, 1889
(RODENTIA, CRICETIDAE)**

V. Yu. Gus'kov, I. N. Sheremetyeva

Variability of mtDNA control region of *Microtus fortis* was investigated for the first time in 11 island populations of the southern Russian Far East. Low nucleotide diversity ($0,01 \pm 0,01$) and high haplotype diversity ($0,949 \pm 0,019$) was noted. Genetic diversity is fully represented both on the mainland and the islands. Phylogenetic analysis showed some differences of voles from the Big Pelis and Matveeva islands (Bay of the Peter the Great, Sea of Japan) from animals inhabiting the mainland and other islands studied. It is suggested that the founder effect and the “bottleneck”, as well as an early separation of these two islands from the mainland could play an important role in the formation of unique genetic aspect of these populations.