Vladivostok/Владивосток	Number/Номер 9: 1–18	December/Декабрь 2003

ISSN 1029-7480

THE NORTH PACIFIC ISLANDS BIOLOGICAL RESEARCHES

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ НА ОСТРОВАХ СЕВЕРНОЙ ЧАСТИ ТИХОГО ОКЕАНА

ОЦЕНКА ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ ОСТРОВНЫХ И МАТЕРИКОВЫХ ПОПУЛЯЦИЙ ДАЛЬНЕВОСТОЧНОЙ ПОЛЕВКИ *MICROTUS FORTIS* (RODENTIA, CRICETIDAE): ДАННЫЕ RAPD-PCR АНАЛИЗА[1]

И. Н. Шереметьева, Г. Н. Челомина

Биолого-почвенный институт ДВО РАН, Владивосток, 690022

Методом RAPD-PCR-анализа суммарной клеточной ДНК дана оценка генетической изменчивости популяций *Microtus fortis* юга Дальнего Востока России. С помощью 9 произвольных праймеров проанализировано 47 образцов. Всего для объединенной выборки выявлено 157 RAPD-локусов, 4 из которых не были обнаружены на островах, а один на материке. В целом для популяций дальневосточной полевки на Дальнем Востоке России характерна низкая генетическая изменчивость (P=5.63–15.33%, D=0.019–0.042, H_e=0.016–0.044, I=0.021–0.059, h=0.023–0.040, n_a=1.06–1.11, n_e=1.02–1.07). Генетическое разнообразие отдельных островных популяций ниже в 1.5–2 раза по сравнению с материковыми. Однако объединенные выборки с островов и материка по большинству генетических показателей статистически значимо не отличаются друг от друга, за исключением наблюдаемого числа аллелей, которое статистически значимо ниже на островах.

Ключевые слова: *генетическое разнообразие, RAPD-PCR-анализ, Microtus fortis, острова, российский Дальний Восток.*

[1]Рисунок на заставке С.В. Гафицкого.

Дальневосточная полевка *Microtus fortis* Buchner, 1889 – политипический вид. Распространен на обширной территории от Забайкалья до Приамурья, в Монголии, Корее, Северо-Восточном Китае. На Дальнем Востоке России *M. fortis* населяет пойменные луговые участки лесостепной зоны южных частей Амурской области и Хабаровского края. В Приморье распространена по долине р. Уссури, на Приханкайской низменности и далее на юг до границы с КНДР, включая острова Японского моря (Костенко, 2000). Описано шесть подвидов, один из которых *M. fortis pelliceus* Thomas, 1911 обитает на Дальнем Востоке России.

На островах залива Петра Великого дальневосточная полевка является самым распространенным видом. Она отмечена даже на очень мелких островах залива (Катин, 1989). Однако эта полевка не была обнаружена на ряде островов – Фуругельма, Стенина (Чугунов, Катин, 1984; Катин, 1989), Верховского, Аскольд (Шереметьев, 2001).

Острова залива Петра Великого имеют материковое происхождение и до последней трансгрессии моря были соединены с материком. Время их отделения датируется возрастом 7–10 тыс. лет (Велижанин, 1976). Следовательно, формирование фауны этих островов происходило в период позднеголоценового похолодания (малая ледниковая эпоха). Таким образом, указанные острова могут представлять удобную модель для изучения особенностей микроэволюционных процессов в малых изолированных популяциях грызунов.

Для изучения внутривидовой структуры и генетической изменчивости различных видов, и грызунов в том числе, большое значение имеют молекулярно-генетические методы, среди которых наиболее часто используется полимеразная цепная реакция с использованием произвольных или специфических праймеров (PCR). В качестве молекулярных маркеров широкое применение получила случайно амплифицированная полиморфная ДНК (RAPD), позволяющая оценить полиморфизм ДНК по большому количеству разных участков генома. Однако для этого метода характерна высокая чувствительность к условиям проведения реакции, что снижает воспроизводимость результатов. Кроме того, доминантное наследование исследованных признаков не позволяет дать точную оценку одного из основных параметров популяции – гетерозиготности.

Целью настоящего исследования является качественная и количественная оценка генетической изменчивости островных и материковых популяций *M. fortis* юга Дальнего Востока России.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материалом послужили ткани (печень) 47 экземпляров дальневосточной полевки, относящейся к подвиду *Microtus fortis pelliceus* Thomas, 1911, из 11 локалитетов юга Дальнего Востока (рис. 1):

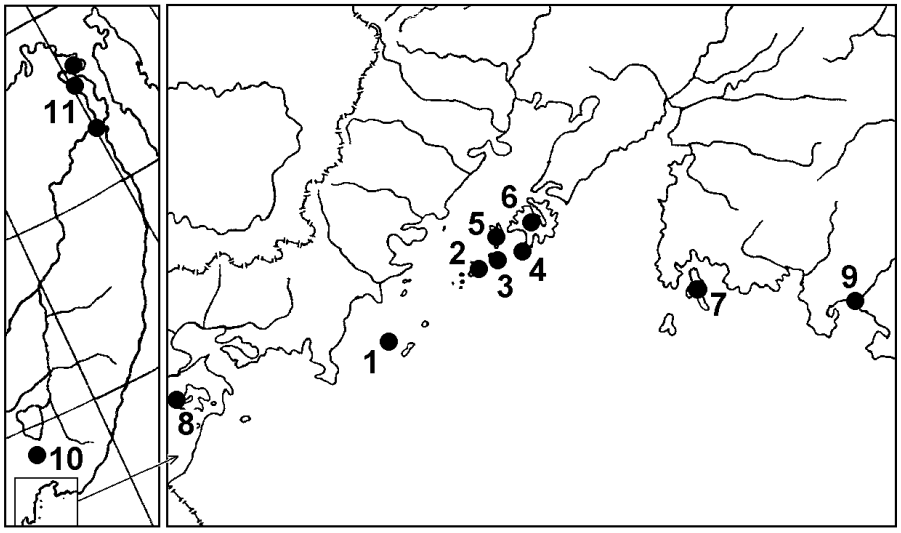


Рис. 1. Места сбора дальневосточной полевки *Microtus fortis* на юге Дальнего Востока России.
1 – о-в Матвеева, 2 – о-в Рикорда, 3 – о-в Рейнеке, 4 – о-в Клыкова, 5 – о-в Попова, 6 – о-в Русский, 7 – о-в Путятина, 8 – окрестности пос. Хасан, 9 – окрестности г. Находка, 10 – окрестности пос. Пограничный, 11 – низовья р. Амур

1. Острова залива Петра Великого – 22 экз.: о-в Путятина – 5 экз., о-в Клыкова – 4 экз., о-в Матвеева – 5 экз., о-в Русский – 1 экз., о-в Попова – 3 экз., о-в Рейнеке – 2 экз., о-в Рикорда – 2 экз.

2. Материковая часть Приморского края – 19 экз.: окрестности пос. Пограничный – 5 экз., г. Находка – 6 экз., пос. Хасан – 8 экз.

3. Хабаровский край, нижнее течение р. Амур – 6 экз.

ДНК получали по стандартной методике (Маниатис и др., 1984), с использованием протеиназы K и с последующей обработкой фенолом, смесью фенол-хлороформ (1:1) и хлороформом, а также переосаждением изопропиловым и этиловым спиртами.

PCR реакцию проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 10 мМ Tris-HCl (pH=8.3), 50 мМ KCl, 0.001% желатина, 0.125 мМ каждого dNTP, 1.5–4.0 мМ $MgCl_2$ (концентрация $MgCl_2$ для каждого праймера определялась экспериментально), 0.5–0.6 ед. Taq полимеразы, 0.25 мкг праймера (Operon, США, табл. 1) и около 70 нг геномной ДНК. Реакцию проводили в амплификаторе Biometra UNOII (Германия). Амплификацию проводили при условиях описанных ранее (Челомина и др., 1999). Использовали режим, состоящий из 40 циклов: 45 сек при 92 °С, 30 сек при 37 °С, 15 сек при 45 °С, 2 мин при 72 °С. Режиму амплификации предшествовала двухминутная денатурация при 94 °С. Завершалась реакция дополнительным 10-минутным синтезом при 72 °С.

Продукты амплификации разделяли путем электрофореза в 2% агарозном геле в 1 х ТВЕ буфере в присутствии 25 млг/мл бромистого этидия. В качестве маркера молекулярной массы использовали Pstl-гидролизат ДНК фага лямбда.

RAPD-профили анализировались по наличию (1) или отсутствию (0) на геле полос, соответствующих определенным фрагментам. Анализ распределения дистанций между особями и расчет коэффициентов корреляции выполнен с помощью программы STATISTICA 6.0 (Боровиков, 1998).

Для оценки генетической изменчивости внутри популяций использовались следующие параметры: попарные генетические дистанции (D); доля полиморфных локусов (P); наблюдаемое и эффективное число аллелей на локус (n_a и n_e, соответственно) (Kimura, Crow, 1964); генное разнообразие (h) (Nei, 1972), индекс гетерогенности выборки Шеннона (I) (Shannon, Weaver, 1949); средняя ожидаемая гетерозиготность (H_e). Расчет генетических параметров проведен с помощью программ POPGENE (версия 1.31) (Yeh, Boyle, 1997), TFPGA (версия 1.3) (Miller, 1997).

Филогенетические реконструкции выполняли с помощью пакетов программ NTSYS (версия 1.40) (Rholf, 1988) и TREECON (Van de Peer, De Wacher, 1994), используя кластерный анализ методами невзвешенного парногруппового арифметического усреднения (UPGMA) и ближайшего соседа (NJ), а также и метод многомерного неметрического шкалирования.

Для выявления микроэволюционных различий на уровне генома в островных и материковых популяциях был использован метод корреляционных плеяд (Терентьев, 1959, 1960).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

RAPD-PCR профили. Для изучения особенностей генетического разнообразия дальневосточной полевки методом RAPD-PCR было использовано 9 произвольных 10-членных олигонуклеотидных праймеров (см. табл. 1). Количество продуцируемых с их помощью фрагментов ДНК варьировало от 18 до 27, составляя в среднем для одного праймера 23. Всего в анализированной выборке идентифицировано 157 RAPD-локусов, каждый из которых представлен в материковых популяциях, и только 152 из них в островных. Минимальное количество RAPD-локусов обнаружено в популяции дальневосточной полевки с о-ва Матвеева – 140, максимальное в популяциях нижнего течения реки Амур – 154. Таким образом, популяции на материке отличались друг от друга по 3

Таблица 1. Список использованных праймеров

Праймер	Нуклеотидная последовательность(5'-3')
OPA-12	TCGGCGATAG
OPA-13	CAGCACCCAC
OPC-02	GTGAGGCGTC
OPC-05	GATGACCGCC
OPC-08	TGGACCGGTG
OPC-10	TGTCTGGGTG
OPC-12	TGTCATCCCC
OPC-16	CACACTCCAG
OPD-05	TGAGCGGACA

(Хасан/Нижний Амур) – 10 (Находка/Хасан) локусам, на островах по 13 локусам (Путятин/Матвеева), а островные популяции от материковых отличаются по 5 (Путятин/Пограничный) – 13 (Матвеева/Хасан) локусам.

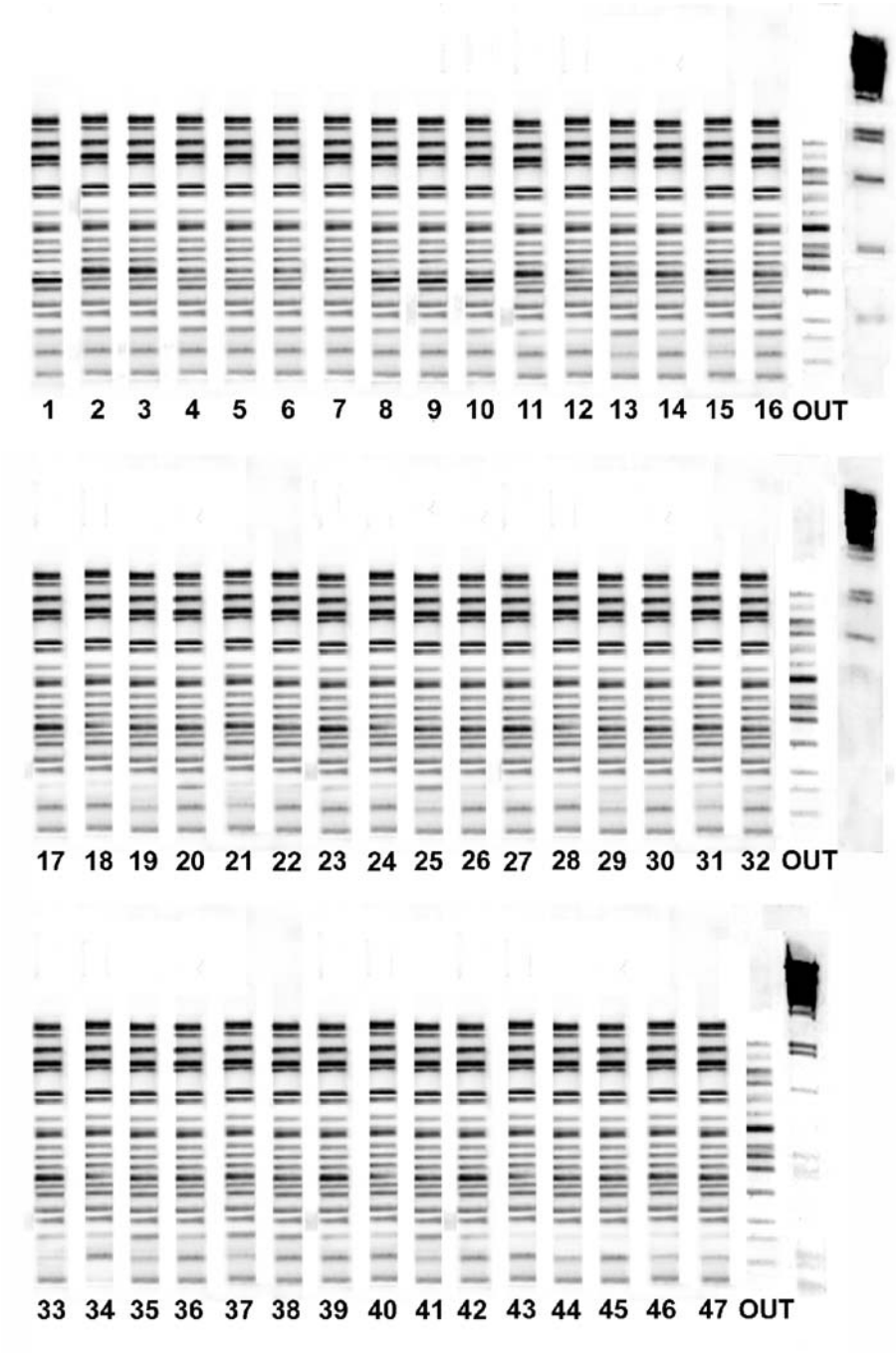
Все RAPD-PCR профили каждого праймера имели высокое сходство у различных особей (рис. 2). Ампликоны праймеров OPC-08 и OPA-13 оказались инвариантны для всех исследованных животных. Остальные праймеры выявляли между сравниваемыми животными единичные отличия как по присутствию/отсутствию амплифицированных последовательностей, так и по их мажорности. Ни для одного из праймеров не удалось выявить маркерные фрагменты ДНК, специфичные для всех полевок из одной или нескольких популяций, но отсутствующие у других. Вместе с тем разные популяции отличались по аллельным частотам анализируемых локусов (табл. 2, рис. 3), что дает возможность использования определенных праймеров для дискриминации различных популяций.

Все обнаруженные полиморфные локусы по частоте встречаемости можно разделить на 4 группы: 1. Редкие локусы как на островах, так и на материке; 2. Редко встречающиеся локусы островных популяций; 3. Редкие локусы материковых популяций; 4. Локусы, частота встречаемости которых высока как на материке, так и на островах.

Из них четыре полиморфных локуса (OPA12-13, OPA12-16, OPC05-7 и OPD05-19) не были обнаружены на островах, а на материке встречаются в различных популяциях с разной частотой. Напротив, локус (OPD05-1) отсутствует на материке, но зарегистрирован в популяциях островов Клыкова и Рейнеке.

Генетическое разнообразие популяций дальневосточной полевки. В таблице 3 представлены основные параметры генетического разнообразия *M. fortis* на юге Дальнего Востока России. Особи с островов Русский, Попова, Рейнеке и Рикорда ввиду их малочисленности были включены только в анализ объединенных выборок. Доля полиморфных локусов в популяциях *M. fortis* варьировала от 5.63% до 15.33%, а в общей совокупности составила 24.8%. Причем популяции островов залива Петра Великого по данному показателю практически не отличались от материковых – P=21.71% и P=21.66%, соответственно.

Среднее число наблюдаемых аллелей на локус (n_a) выше в материковых популяциях. Данный показатель изменяется от 1.038 (Клыкова) до 1.066 (Матвеева) в островных популяциях и от 1.085 (Находка) до 1.109 (Пограничный и Хасан) в материковых, составляя в целом 1.056 и 1.161 соответственно. Изменчивость эффективного числа аллелей (n_e) в исследованных популяциях имеет ту же закономерность: 1.02–1.047 на островах и 1.056–1.068 на материке, но в целом они не отличаются – 1.089 и 1.091, соответственно. В общей совокупности наблюдаемое число аллелей на локус существенно выше, чем отдельно на материке или островах: n_a=1.185, а среднее эффективное число аллелей практически не изменилось: n_e=1.085.


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 OUT
17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 OUT
33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 OUT

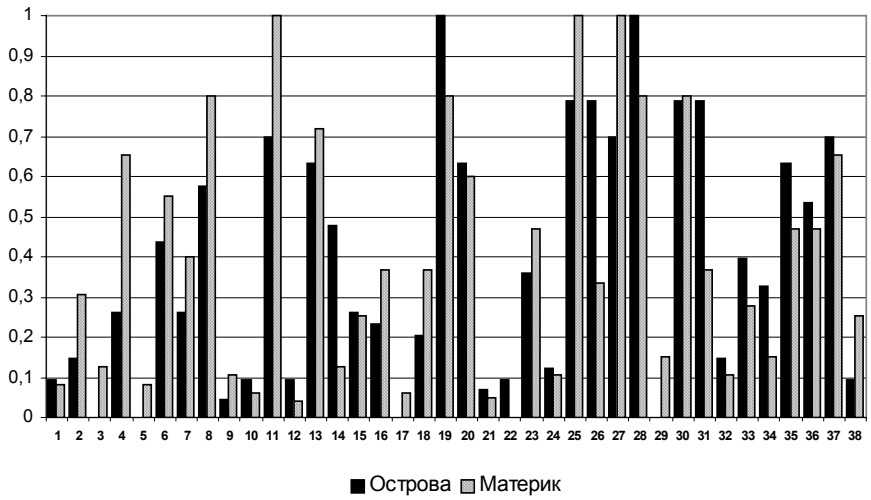


Рис. 3. Частота встречаемости полиморфных RAPD-PCR-локусов у *Microtus fortis* на островах и материке. Номера – локусы RAPD-PCR

Эффективное число аллелей (n_e) является функцией от доли полиморфных локусов, числа аллелей на локус и выравненности частот аллелей и таким образом является мерой генетического разнообразия популяции или вида. Эффективное число аллелей оценивает величину, обратную гомозиготности, и представляет собой такое число аллелей, при одинаковой частоте которых в популяции гетерозиготность будет равна фактической. Низкому эффективному числу аллелей в исследуемых выборках соответствует и низкое значение гетерозиготности.

Действительно, в исследуемых популяциях значение средней ожидаемой гетерозиготности по всем локусам (H_e*) изменяется в узких пределах: от 0.0147 до 0.0266 у островных и от 0.0317 до 0.0395 у материковых популяций. На видовом уровне ожидаемая гетерозиготность по всем локусам возрастает в 1.4–3.5 раз и составляет H_e*=0.0534. Причем вклад в это разнообразие в равной мере вносят как материковые (H_e*=0.0530), так и островные популяции (H_e*=0.0541).

Все изученные популяции характеризовались также и низким уровнем генного разнообразия (h), которое между материковыми и островными популяциями распределялось неравномерно. Среднее внутри популяционное генное

Рис. 2. RAPD-PCR профили *Microtus fortis*.
1–22 – электрофоретический номер особи с островов залива Петра Великого,
23–47 – электрофоретический номер особи материка,
OUT – внешняя группа (*Apodemus peninsulae*)

Таблица 2. Частота встречаемости полиморфных локусов в исследованных

Локусы	Путятин	Клыкова	Матвеева	Острова	Находка	Пограничный
OPA12-2	0.5528	0.0000	0.0000	0.0955	0.0000	0.0000
OPA12-6	0.5528	0.0000	0.0000	0.1472	0.4226	0.2254
OPA12-13	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1056
OPA12-14	1.0000	0.0000	0.0000	0.2615	0.2929	1.0000
OPA12-16	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.2254
OPA12-17	1.0000	0.5000	0.3675	0.4359	1.0000	0.5528
OPA12-24	0.2254	0.0000	1.0000	0.2615	0.2929	0.3675
OPA12-25	1.0000	1.0000	0.1056	0.5736	0.5918	1.0000
OPA12-26	0.0000	0.0000	0.2254	0.0465	0.1835	0.1056
OPC16-20	0.1056	0.1340	0.0000	0.0955	0.0871	0.1056
OPC16-21	1.0000	0.5000	1.0000	0.6985	1.0000	1.0000
OPC10-1	0.3675	0.0000	0.0000	0.0955	0.0871	0.1056
OPC10-15	1.0000	1.0000	0.2254	0.6307	0.5918	0.5528
OPC10-16	1.0000	1.0000	1.0000	0.4778	1.0000	1.0000
OPC10-18	1.0000	1.0000	0.0000	0.2615	0.2929	0.2254
OPC10-19	0.1056	0.5000	0.0000	0.2313	0.1835	0.5528
OPC05-7	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
OPC05-13	1.0000	0.0000	0.0000	0.2023	0.4226	0.3675
OPC05-21	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
OPC05-22	1.0000	1.0000	0.2254	0.6307	1.0000	1.0000
OPC05-28	0.0000	0.0000	0.3675	0.0707	0.0000	0.0000
OPD05-1	0.0000	0.5000	0.0000	0.0935	0.0000	0.0000
OPD05-2	0.3675	0.1340	1.0000	0.3604	0.5918	0.3675
OPD05-4	0.1056	0.0000	0.0000	0.1210	0.0871	0.0000
OPD05-5	0.5528	1.0000	1.0000	0.7868	1.0000	1.0000
OPD05-6	1.0000	1.0000	1.0000	0.7868	0.5918	0.5528
OPD05-7	0.5528	1.0000	0.5528	0.6985	1.0000	1.0000
OPD05-16	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
OPD05-19	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
OPD05-20	1.0000	1.0000	0.5280	0.7868	1.0000	0.5528
OPC02-1	1.0000	1.0000	0.5528	0.7868	0.0000	0.1056
OPC02-2	0.3675	0.0000	0.0000	0.1472	0.0000	0.1056
OPC02-6	1.0000	0.1340	0.2254	0.3970	0.2929	0.2254
OPC02-7	0.5528	0.0000	0.3675	0.3253	0.0000	0.2254
OPC02-21	1.0000	1.0000	0.3675	0.6307	1.0000	0.3675
OPC02-22	1.0000	1.0000	0.0000	0.5333	0.2929	0.1056
OPC02-23	1.0000	1.0000	0.5528	0.6985	0.5918	0.3675
OPC12-2	0.1056	0.2929	0.1056	0.0955	0.0871	0.3675

разнообразие для островных популяций составило 0.0183, а для материковых – 0.0365. Наибольшее генное разнообразие выявлено в двух популяциях материка: поселки Пограничный и Хасан: 0.0395 и 0.0397, соответственно. Среди островных полевок наибольшее генное разнообразие отмечено в популяции о-ва Матвеева – 0.0266, что на 16.2% меньше, чем минимальное (0.0317) генное

популяциях дальневосточной полевки *Microtus fortis*

Центральное Приморье	Хасан	Приморье	Нижний Амур	Материк
0.0000	0.2929	0.1115	0.0000	0.0832
0.3258	0.3876	0.3511	0.1835	0.3072
0.0465	0.0646	0.0541	0.4226	0.1282
0.4778	1.0000	0.6026	1.0000	0.6536
0.0955	0.0646	0.0823	0.0871	0.0835
0.6985	0.6464	0.6756	0.2929	0.5528
0.3258	1.0000	0.4870	0.1835	0.4000
0.6985	1.0000	0.7706	1.0000	0.8000
0.1472	0.0646	0.1115	0.0871	0.1056
0.0955	0.0000	0.0541	0.0871	0.0619
1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
0.0955	0.0000	0.0541	0.0000	0.0408
0.5736	1.0000	0.6756	1.0000	0.7172
1.0000	0.2094	0.0823	0.2929	0.1282
0.2615	0.2929	0.2745	0.1835	0.2517
0.3258	0.2929	0.3118	0.5918	0.3675
0.0000	0.0646	0.2637	0.1835	0.0619
0.3970	0.6464	0.4870	0.0871	0.3675
1.0000	0.6464	0.7706	1.0000	0.8000
1.0000	0.3876	0.6026	0.5918	0.6000
0.0000	0.0000	0.0000	0.1835	0.0480
0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
0.4778	0.3876	0.4380	0.5918	0.4708
0.0465	0.1340	0.0823	0.1835	0.1056
1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
0.5736	0.2094	0.3930	0.1835	0.3367
1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
1.0000	0.6464	0.7706	1.0000	0.8000
0.0000	0.3876	0.1416	0.1835	0.1515
0.6935	1.0000	0.7706	1.0000	0.8000
0.0465	1.0000	0.2745	1.0000	0.3675
0.0465	0.2929	0.1416	0.0000	0.1056
0.2615	0.2094	0.2391	1.0000	0.2789
0.0955	0.2094	0.1416	0.1835	0.1515
0.5733	0.3876	0.4870	0.4226	0.4708
0.2023	1.0000	0.3930	1.0000	0.4708
0.4778	1.0000	0.6026	1.0000	0.6536
0.2023	0.3876	0.2745	0.1835	0.2517

разнообразие материковых популяций. На уровне вида генное разнообразие составило 0.0524 (при несколько большем значении h=0.0541 для объединенных островных и меньшем h=0.053 для материковых выборок), хотя средний показатель для популяций оказался равным всего 0.0256.

Таблица 3. Параметры генетического разнообразия 11 популяций дальневосточной полевки *Microtus fortis* на юге Дальнего Востока России

Популяция	N	n_a	n_e	h	I	H_e*	H_e	P, %	D
О. Путятина (n=5)	150	1,0616 (0,2410)	1,0425 (0,1848)	0,0236 (0,0980)	0,0346 (0,1406)	0,0236	0,0262	8,67	0,0196
О. Клыкова (n=4)	142	1,0379 (0,1914)	1,0266 (0,1484)	0,0147 (0,0783)	0,0216 (0,1124)	0,0147	0,0168	5,63	0,0187
О. Матвеева (n=5)	140	1,0664 (0,2495)	1,0474 (0,1916)	0,0266 (0,1036)	0,0388 (0,1491)	0,0266	0,0296	10	0,0271
Острова (n=22)	**152**	**1,0564 (0,3641)**	**1,0909 (0,2388)**	**0,0541 (0,1351)**	**0,0815 (0,1983)**	**0,0541**	**0,0554**	**21,71**	**0,0394**
Г. Находка (n=6)	146	1,0853 (0,2800)	1,0556 (0,2017)	0,0317 (0,1106)	0,0469 (0,1601)	0,0317	0,0346	12,33	0,0226
Пос. Пограничный (n=5)	150	1,1090 (0,3124)	1,0683 (0,2198)	0,0395 (0,1205)	0,0588 (0,1752)	0,0395	0,0439	15,33	0,0421
Центральное Приморье (n=11)	**151**	**1,1232 (0,3295)**	**1,0715 (0,2235)**	**0,0414 (0,1227)**	**0,0621 (0,1782)**	**0,0414**	**0,0434**	**17,22**	**0,0346**
Пос. Хасан (n=8)	153	1,1090 (0,3124)	1,0685 (0,2171)	0,0397 (0,1214)	0,0589 (0,1764)	0,0395	0,0439	15,03	0,0374
Приморье (n=19)	**157**	**1,1564 (0,3641)**	**1,0893 (0,2424)**	**0,0524 (0,1345)**	**0,0789 (0,1962)**	**0,0524**	**0,0538**	**21,02**	**0,0403**
Нижнее течение р. Амур (n=6)	154	1,1043 (0,3063)	1,0574 (0,1906)	0,0350 (0,1091)	0,0532 (0,1625)	0,0350	0,381	14,29	0,0375
Материк (n=25)	**157**	**1,1611 (0,3685)**	**1,0892 (0,2390)**	**0,0530 (0,1335)**	**0,0803 (0,1957)**	**0,0530**	**0,0541**	**21,66**	**0,0419**
В целом (n=47)	**157**	**1,1848 (0,3891)**	**1,0854 (0,2272)**	**0,0524 (0,1279)**	**0,0816 (0,1892)**	**0,0534**	**0,0539**	**24,8**	**0,0425**

Примечание. n – величина выборки; N – число идентифицированных RAPD-локусов; H_e – средняя ожидаемая гетерозиготность по всем локусам; H_e* – гетерозиготность по всем локусам не смещенная (с поправкой на величину выборки); D – среднее значение попарных генетических дистанций между особями в локальной популяции. В скобках – среднеквадратичное отклонение. Остальные обозначения см. в тексте.

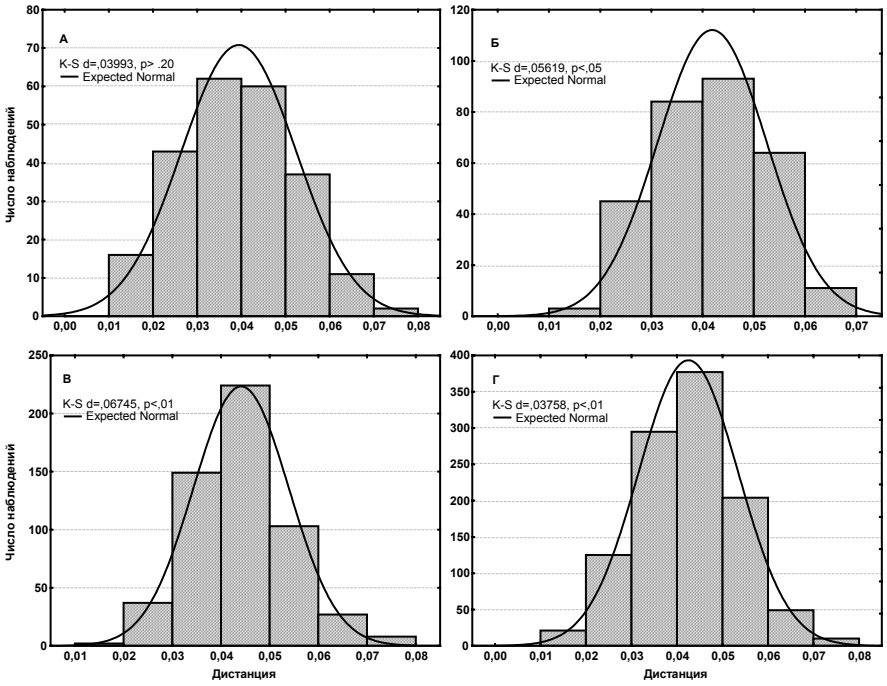


Рис. 4. Распределение попарных генетических дистанций дальневосточной полевки *Microtus fortis* между особями. А – между островами залива Петра Великого; Б – между материковыми популяциями; В – между островами и материком; Г – в целом для всех выборок. K-S – значение критерия Колмогорова-Смирнова

Значения дистанций (D) при попарном сравнении особей дальневосточной полевки варьировали на островах в более широких пределах (0.0104–0.0786), чем на материке (0.0144–0.0695). Средние значения дистанций D между особями популяциях дальневосточной полевки *Microtus fortis* внутри островных выборок выборок были ниже, чем у материковых и варьировали от 0.0187 (Клыкова) до 0.0271 (Матвеева) и от 0.0226 (Находка) до 0.0421 (Пограничный) соответственно. В целом среднее значение попарных генетических дистанций составило 0.0425, которое не отличается от аналогичных оценок для объединенных островных (D=0.0394) и материковых (D=0.0419) выборок. Такая же закономерность обнаружена при анализе индексов гетерогенности выборки (см. табл. 3).

Значение попарных дистанций между особями материка, а также между островными и материковыми особями имеют статистически достоверное нормальное распределение ($p<0.05$ и $p<0.01$, соответственно) (рис. 4). Распределение дистанций между особями островов статистически значимо отличается от нормального ($p>0.2$), что свидетельствует о неоднородности выборки. Дей-

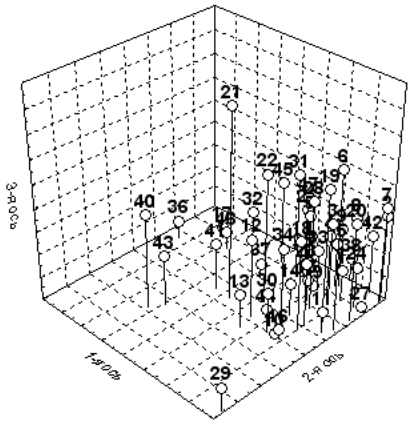


Рис. 5. Распределение особей *Microtus fortis* в пространстве первых трех координат многомерного шкалирования. Обозначение как на рис. 2

ствительно, объединенная островная выборка представлена особями различных островов залива Петра Великого, которые отличались продолжительностью изоляции, как от материка, так и друг от друга (7–10 тыс. лет) (Велижанин, 1976). Популяция каждого острова имеет индивидуальную историю становления и развития, а также особые условия обитания. Для всей совокупости выборок распределение дистанций D между особями дальневосточной полевки имеют статистически значимое нормальное распределение ($p<0.01$).

Филогенетический анализ. Более подробный анализ генетической изменчивости между особями, проводили с помощью трех различных методов: метод многомерного шкалирования

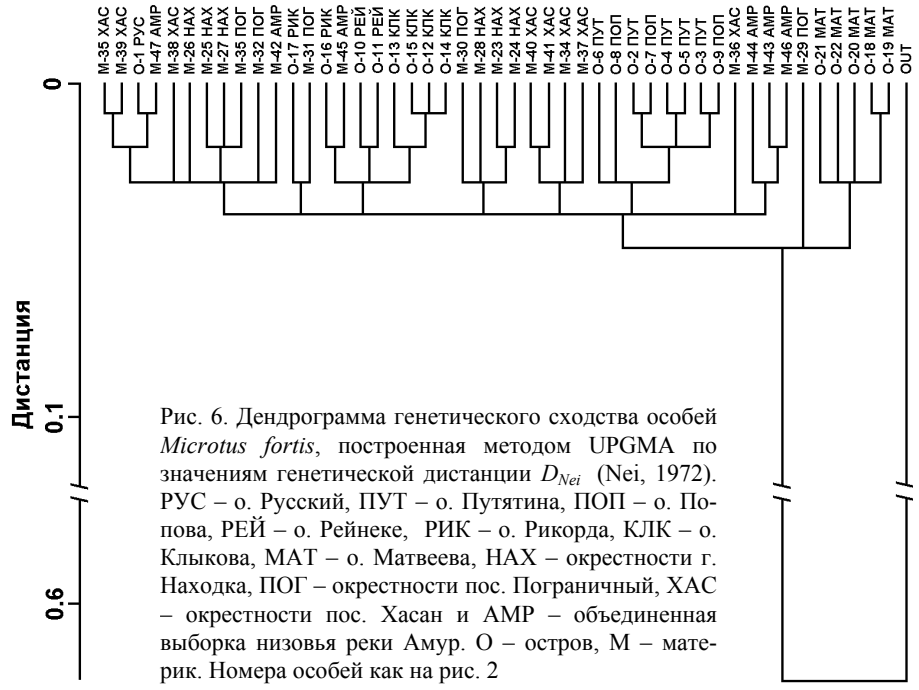


Рис. 6. Дендрограмма генетического сходства особей *Microtus fortis*, построенная методом UPGMA по значениям генетической дистанции D_{Nei} (Nei, 1972). РУС – о. Русский, ПУТ – о. Путятина, ПОП – о. Попова, РЕЙ – о. Рейнеке, РИК – о. Рикорда, КЛК – о. Клыкова, МАТ – о. Матвеева, НАХ – окрестности г. Находка, ПОГ – окрестности пос. Пограничный, ХАС – окрестности пос. Хасан и АМР – объединенная выборка низовья реки Амур. О – остров, М – материк. Номера особей как на рис. 2

построение проводили по матрице значений попарных генетических дистанций в трехмерном пространстве (рис. 5), а также метод кластерного анализа UPGMA (рис. 6) и NJ (рис. 7) генетического сходства рассчитанным по данным RAPD-PCR анализа. Расположение исследованных особей в трехмерном пространстве по результатам многомерного шкалирования не проявляет строгой разделения дальневосточной полевки на островные и материковые формы, все экземпляры образуют одну однородную группу. Результаты кластерного анализа двумя разными методами объединения кластеров в основном совпадают и в целом согласуются с результатами многомерного шкалирования. Следует отметить, что на дендрограмме построенной методом UPGMA особи дальневосточной полевки разделены на два подкластера: в первый включены только полевки острова Матвеева, а во второй особи с остальных островов и материка.

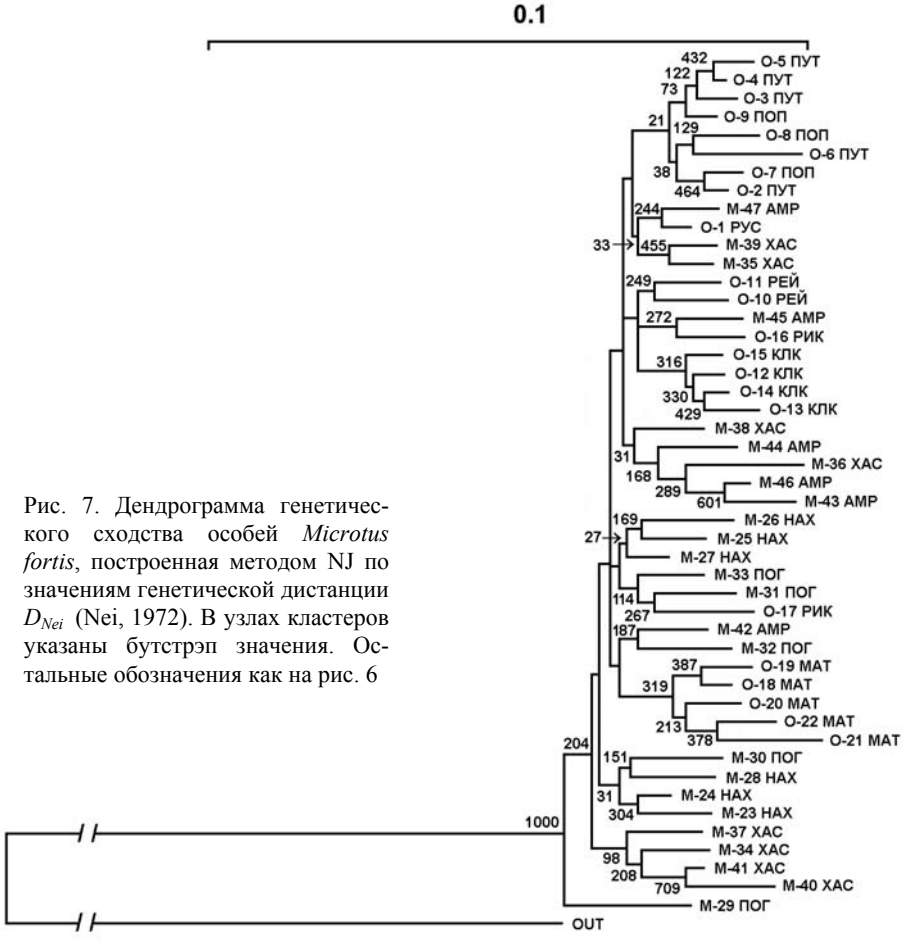


Рис. 7. Дендрограмма генетического сходства особей *Microtus fortis*, построенная методом NJ по значениям генетической дистанции D_{Nei} (Nei, 1972). В узлах кластеров указаны бутстрэп значения. Остальные обозначения как на рис. 6

Корреляционный анализ. Исследования биологических объектов со многими признаками представляет собой довольно сложную задачу, так как рассмотрение более чем трех показателей часто бывает довольно затруднено. Поэтому для оценки таких систем предлагались разные приемы и методы. Один из них – метод корреляционных плеяд (Терентьев, 1959, 1960), который позволяет изучить связи набора показателей и установить наиболее важные из них (индикаторы).

Возникновение корреляционных плеяд неразрывно связано с повышением относительной роли внутренних факторов развития, по сравнению с внешними (Берг, 1964). Внутренние факторы осуществляют свое действие в изменяющихся условиях среды, придавая течению процессов специфичность в соответствии со своими особенностями. Все признаки организма образуются в процессе развития в результате взаимодействия наследственных (внутренних) факторов со средой. Роль внешних и внутренних факторов в развитии разных признаков различна и может меняться в ходе эволюции. В отношении одних признаков внешние воздействия сохраняют формирующее значение, другие признаки находятся под жестким генетическим контролем.

Нами были вычислены коэффициенты корреляции между полученными генетическими характеристиками популяций островов и материка, построены корреляционные плеяды для разных уровней достоверности ($p<0.01$, $p<0.05$ и $p<0.001$). Как видно из рис. 8, островные и материковые популяции имеют одну общую плеяду, включающую все основные генетические параметры популяций (h, H_e*, n_a, n_e, P, D, I). Несмотря на незначительные различия в составе самих плеяд (в состав плеяды островных популяций не включен показатель N, а материковых популяций – H_e) индикаторы у них одни и те же (h, H_e*, n_a, P). Вместе с тем, в характере плеяд обнаруживаются существенные отличия. Так в островных популяциях уже на уровне $p<0.01$ выпадает из плеяды показатель D, но все остальные параметры даже на уровне $p<0.001$ имеют устойчивые корреляционные связи и образуют общую плеяду. В материковых популяциях на уровне $p<0.01$ происходит выпадение лишь показателя N, а показатель D остается в составе плеяды. Однако на уровне $p<0.001$ в материковых популяциях происходит выпадение из плеяды всех показателей кроме h и H_e*.

Корреляционный анализ также указал на отсутствие достоверных корреляционных связей между основными генетическими показателями, как с географическим местом положения материковых популяций, так и площадью исследованных островов. Вместе с тем, обнаружены достоверные корреляционные связи основных генетических показателей (n_e, n_a, h, I, H_e*, P) с изолированностью популяций дальневосточной полевки. Причем корреляционные связи изолированности с n_a, I и P ($p<0.01$) более сильные, чем с остальными показателями.

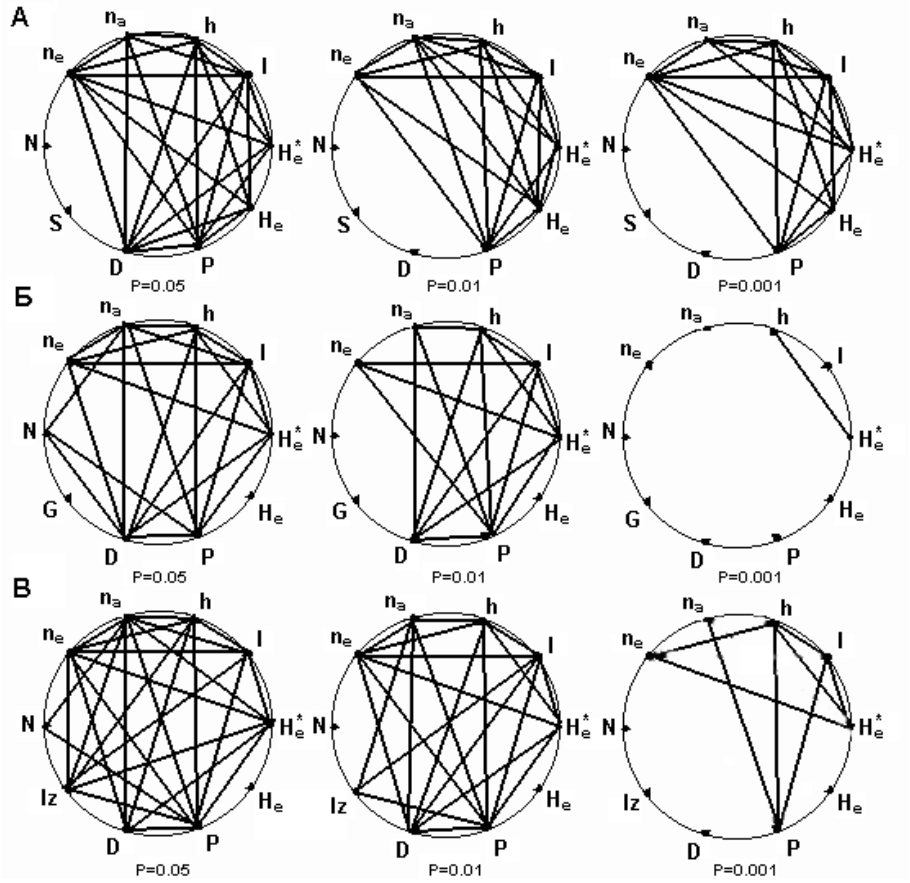


Рис. 6. Корреляционная структура молекулярно-генетических характеристик дальневосточной полевки *Microtus fortis*. А – острова залива Петра Великого; Б – материк; В – в целом для всех выборок. N, n_e, n_a, h, I, H_e*, H_e, P и D – основные генетические параметры (см. табл. 3), S – площадь острова, G – географическая широта, Iz – изолированность

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты RAPD-PCR анализа дальневосточной полевки *Microtus fortis* продемонстрировали высокий уровень генетического сходства популяций на фоне относительно высокой индивидуальной изменчивости. В целом для вида выявлено 157 RAPD-локусов, из которых 5 были только на материке, и отсутствовали на островах. Скорее всего, эти локусы могут быть обнаружены в еще не исследованных изолированных популяциях. В результате анализа нам не удалось выявить маркерные фрагменты ДНК для одной или нескольких попу-

ляций, однако для разных популяции были обнаружены отличия по аллельным частотам сравниваемых локусов.

В целом вид характеризуется достаточно низким уровнем генетического разнообразия, распределение которого имеет некоторые особенности. Так, все популяции островов имеют существенно (до 1.5–2 раз) пониженные значения генетических параметров по сравнению с таковыми материка. Это, безусловно, является следствием их островной изоляции и случайного закрепления определенных генотипических вариантов. Однако объединенные островные и материковые выборки по всем генетическим показателям между собой практически не отличаются. Исключение составляет наблюдаемое число аллелей, которое существенно ниже на островах, чем на материке, или у вида в целом. Таким образом, генетическое разнообразие дальневосточной полевки в полной мере представлено как на островах, так и на материке, но каждая отдельно взятая популяция острова генетически обеднена по сравнению с популяцией материка. Любая материковая популяция представляет большее количество генетического разнообразия вида, чем популяция островов.

Полученные результаты можно объяснить эффектом кратковременного, в масштабах эволюции, отделения островов от материка, когда естественный отбор еще не завершен, либо в полной мере проявиться еще не успел. Тем не менее, генетическая дифференциация островных и материковых популяций уже началась, о чем свидетельствует характер распределения общего генетического разнообразия, генетических дистанций (достоверные отклонения от нормальной кривой зарегистрированы только в объединенной островной выборке) и аллельных частот в частности, а также данные корреляционного анализа, ясно указывающие на наличие особенностей микроэволюционных процессов на уровне генома в островной и материковой частях ареала дальневосточной полевки.

Авторы выражают глубокую признательность за предоставленный материал сотрудникам лабораторий эволюционной зоологии и генетики и териологии Биолого-почвенного института ДВО РАН: И.В. Картавцевой, В.П. Кораблеву, К.В. Коробицыной, М.В. Павленко, М.П. Тиунову и И.С. Шереметьеву. А также Е.В. Захарову за критические замечания к рукописи.

ЛИТЕРАТУРА

Берг Р.Л. 1964. Корреляционные плеяды и стабилизирующий отбор. *Применение математических методов в биологии.* Л.: Изд-во ЛГУ. С. 23–60.

Боровиков В.П. 1998. *Популярное введение в программу STATISTICA*. Компьютер Пресс. 266 с.

Велижанин А.Г. 1976. Время изоляции материковых островов северной части Тихого океана. *Докл. 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.

Костенко В.А. 2000. *Грызуны (Rodentia) Дальнего Востока России*. Владивосток: Даль-наука. 209 с.

Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. 1984. *Молекулярное клонирование*. М.: Мир.

Терентьев П.В. 1959. Метод корреляционных плеяд. *Вестн. ЛГУ*. 9, 2. С. 137–141.

Терентьев П.В. 1960. Дальнейшее развитие метода корреляционных плеяд. *Применение математических методов в биологии*. Л.: Изд-во ЛГУ. С. 27–36.

Челомина Г.Н., Спиридонова Л.Н., Козыренко М.М., Артюкова Е.В., Челомин Ю.В., Журавлев Ю.Н. 1999. Использование ПП-ПЦР анализа клеточной ДНК для оценки генетического полиморфизма и подвидовой диагностики дальневосточного леопарда *Panthera pardus orientalis*. *Генетика*. Т. 35. № 5. С. 681–687.

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.

Шереметьев И.С. 2001. Формирование наземной териофауны островов залива Петра Великого (Японское море). *Вестник ДВО РАН*. № 4. С. 11–22.

Kimura M., Crow J.F. 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics*. Vol. 49. P. 725–738.

Miller M.P. 1997. *Tools for population genetic analysis (TFPGA) 1.3: A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data.* (Computer software distributed by author)

Nei M. 1972. Genetic distance between populations. *Am. Nar*. V. 106. P. 283–292.

Rholf F.J. 1988. *NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system*. Version 1.40. Applied Biostatistics Inc. Exeter Publishing LTD. N.Y.

Shannon C.E., Weaver W. 1949. *The mathematicae theory of communication*. Univ. of Illinois Press, Urbana.

Van de Peer Y., De Wacher R. 1994. TREECON for Windows: a software packege for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Comput. Applic. Biosci*. V. 10. P. 569–570.

Yeh F.C., Boyle T.J.B. 1997. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. *Belgian J. Botany*. V. 129. P. 157.

EVALUATION OF GENETIC DIVERSITY IN ISLAND AND MAINLAND POPULATIONS OF FAR EASTERN VOLES *MICROTUS FORTIS* (RODENTIA, CRCETIDAE): DATA OF RAPD-PCR ANALYSIS

I. N. Sheremetyeva, G. N. Chelomina

Institute of Biology and Soil Science, Vladivostok 690022

Key words: *reed vole, isolation, genetic diversity, RAPD-PCR, islands, Russian Far East*.

For the first time evaluation of *Microtus fortis* populations from the South of the Russian Far East was conducted by method of RAPD-PCR analysis of total cellular DNA. 47 were analyzed using 9 arbitrary primers. In total 157 RAPD-loci were revealed, from them 5 loci did not find on islands, but no primers were possible to reveal DNA fragments specific to a certain population. In a whole, Far Eastern reed vole demonstrated not high level of variability (P=5.63–15.33%, D=0.019–0.042, H_e=0.016–0.044, I=0.021–0.059, h=0.023–0.040,

n_a=1.06–1.11, n_e=1.02–1.07). Moreover, genetic diversity was distributed non-uniformly between island and mainland populations: each mainland population shared a bigger part of genetic diversity (in 1.5–2 times) than any population of islands. Nevertheless, united vole sets of mainland and islands were almost undistinguished, of exception of allele frequencies. Correlation analysis of genetic characteristics pointed to differences of microevolutionary process in island populations in comparison with mainland ones.

© **North Pacific Islands Biological Researches (N. Pac. Isl. biol. res.)**

Journal published by Institute of Biology and Soil Sciences, Far East Branch of Russian Academy of Sciences since Yuly 1999

Editor-in-Chief: S.K. Kholin
Editorial Board: V.V. Bogatov, S.Yu. Storozhenko, E.A. Makarchenko, A.P. Kryukov, V.P. Bulgakov, V.Yu. Barkalov
Address: Institute of Biology and Soil Sciences, Far East Branch of Russian Academy of Sciences, 690022, Vladivostok-22, Russia
FAX: +7-(4232)-310-193
E-mail: entomol@ibss.dvo.ru

© **Биологические исследования на островах северной части Тихого океана (Биол. иссл. на островах северной части Тихого океана)**

Журнал публикуется Биолого-почвенным институтом Дальневосточного отделения Российской Академии Наук с июля 1999 г.

Главный редактор: С.К. Холин
Редакционная коллегия: В.В. Богатов, С.Ю. Стороженко, Е.А. Макарченко, А.П. Крюков, В.П. Булгаков, В.Ю. Баркалов
Адрес: Биолого-почвенный институт ДВО РАН, 690022, Владивосток, Россия
FAX: +7-(4232)-310-193
E-mail: entomol@ibss.dvo.ru