

УДК 575.174:599.742.4

ВНУТРИВИДОВАЯ СТРУКТУРА СОБОЛЯ (*Martes zibellina* L.) ПО ДАННЫМ ИЗМЕНЧИВОСТИ НУКЛЕОТИДНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ГЕНА ЦИТОХРОМА b МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК

© 2010 г. Б. А. Малярчук, А. В. Петровская, М. В. Деренко

Институт биологических проблем Севера Дальневосточного отделения Российской академии наук, Магадан 685000;
e-mail: malyarchuk@ibpn.ru

Поступила в редакцию 16.12.2008 г.

Определены нуклеотидные последовательности участка гена цитохрома b митохондриальной ДНК (мтДНК) соболя, обитающего в Магаданской области, Хабаровском крае и на Камчатке. С помощью филогенетического анализа показано существование двух кластеров – А и ВС, дивергенция между которыми достигает 1.4%. Результаты анализа медианных сетей гена цитохрома b свидетельствуют о том, что разделение предковой популяции соболя произошло в раннем плейстоцене (примерно 1 млн. лет назад), а экспансия его более молодой филогенетической группы А произошла в позднем плейстоцене примерно 120 тыс. лет назад.

Молекулярно-генетические исследования различных видов семейства куньих Mustelidae, проведенные с помощью филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей 22 участков генома (примерно 12 тысяч пар нуклеотидов), позволили выявить четыре основные клады и три монотипические группы [1]. Обитающие в Евразии куницы подсемейства Martinae (соболь *Martes zibellina* L., лесная куница *M. martes* L., каменная куница *M. foina* и харза *M. flavigula*) образуют монофилетическую группу, и среди них наиболее высокое межвидовое генетическое сходство обнаружено между соболем и лесной куницей [1]. Между тем исследования генетического полиморфизма популяций соболя показали существование внутривидовой гетерогенности [2, 3]. Согласно результатам анализа рестрикционного полиморфизма генов митохондриальной ДНК (мтДНК), в популяциях соболя, обитающего в Сибири и на Дальнем Востоке, распространены три гаплотипа – А, В и С, каждый из которых представляет, по-видимому, группу монофилетических линий [2–4], однако для анализа этого вопроса необходимы более тонкие исследования изменчивости мтДНК на уровне нуклеотидных последовательностей. Ранее проводились исследования изменчивости нуклеотидных последовательностей гена цитохрома b мтДНК, однако они ограничивались главным образом островными популяциями Японии [5]. Отмечен также случай появления митохондриального гаплотипа соболя в генофонде лесной куницы (в Швеции), что объяснялось межвидовой гибридизацией в контактной зоне, хотя и не исключалась парафилия группы *M. martes* и *zibellina* [6].

Для соболя характерна высокая изменчивость морфологических признаков, что препятствует разработке единой внутривидовой систематики [7, 8]. Лишь камчатская популяция соболя выделяется, по мнению многих ученых, в камчатский подвид *M. z. kamtschadalica* [8, 9]. Территорию Хабаровского края населяют популяции соболя, относящегося к подвиду *M. z. jakutensis*, а на большей части Магаданской области сформировались местные гибридные популяции соболей указанных выше подвидов [10, 11]. Очевидно, что для дальнейшего исследования проблемы межвидовых взаимоотношений у куньих необходимы новые данные об изменчивости мтДНК. Целью настоящей работы является, таким образом, анализ филогенетических взаимоотношений нуклеотидных последовательностей гена цитохрома b мтДНК соболя из популяций Магаданской области, Камчатки и Хабаровского края.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали образцы мышечной ткани соболя (*M. zibellina* L.) из трех мест его ареала – Хабаровского края (5 экземпляров), Центральной Камчатки (2 экземпляра) и Магаданской области (10 экземпляров). Проанализированные образцы хранятся в коллекции биологических тканей животных в лаборатории генетики ИБПС ДВО РАН. Геномную ДНК выделяли с использованием стандартных методов, включающих лизис клеток протеиназой К (Sigma, USA) в присутствии 1%-ного додецилсульфата натрия, очистку ДНК смесью фенола и хлороформа и осаждение ДНК этиловым спиртом.

Таблица 1. Список образцов соболя, исследованных в настоящей работе

Номер образца, кластер мтДНК	Популяция	Номер в базе данных GenBank
6373, B	Хабаровский край, Лазовский район	FJ430695
6382, B	То же	FJ430696
5970, C	Хабаровский край, Верхнебуреинский район	FJ430693
Miau 2, C	Магаданская область, Мянунджа	FJ430707
M 6, A	Камчатка, Мильковский район	FJ430705
5980, A	Хабаровский край, Верхнебуреинский район	FJ430694
M 15, A	Камчатка, Мильковский район	FJ430706
5916, A	Хабаровский край, Лазовский район	FJ430692
B 20, A	Магаданская область, Балыгычан	FJ430697
E1 11, A	Магаданская область, Эльген	FJ430704
Ver 16, A	Магаданская область, Берелех	FJ430703
B 82, A	Магаданская область, Балыгычан	FJ430702
Miau 13, A	Магаданская область, Мянунджа	FJ430691
B 27, A	Магаданская область, Балыгычан	FJ430698
B 28, A	То же	FJ430699
B 47, A	»	FJ430701
B 35, A	»	FJ430700

Для анализа изменчивости мтДНК исследовали фрагмент гена цитохрома b (длиной 720 пар нуклеотидов), амплифицированный с использованием праймеров и условий полимеразной цепной реакции, описанных ранее [2]. Секвенирование амплифицированных фрагментов мтДНК проведено по стандартной методике с использованием набора для циклического секвенирования ДНК Big Dye Terminator (Applied Biosystems, v. 3.1) и генетического анализатора ABI Prism 3130 (Applied Biosystems, США). Выравнивание и анализ нуклеотидных последовательностей проводили с помощью программ пакета MEGA 3.1 [12].

Для проведения филогенетического анализа использовали метод “ближайшего соседа” (NJ-анализ) и 2-параметрную модель Кимуры (пакет программ MEGA 3.1). Филогенетический анализ проводили также с помощью байесовского метода (BI, Bayesian Inference), использующего алгоритм Монте-Карло и марковские цепи (пакет программ Beast v1.4.7) [13]. Для анализа использовали модель НКУ+I+G, т.е. модель Hasegawa–Kishino–Yano (НКУ), включающую предположение о том, что различные нуклеотидные позиции могут эволюционировать с различной скоростью и могут быть инвариантными (I), а вариабельность скорости нуклеотидных замен следует гамма-распределению (G). Для BI-анализа создавали 10 миллионов марковских цепей, отбирая деревья через каждые 500 генераций. Из анализа исключали первые 3000 деревьев, считая их неустойчивыми; информацию об оставшихся 10000 деревьях суммировали в виде единственного филоге-

нетического дерева (“target” tree) с помощью программы TreeAnnotator v1.4.7 [13].

Для построения медианных сетей применяли алгоритм MJ (Median-Joining) (программа Network 4.5) [14]. Степень дивергенции мтДНК оценивали с помощью дистанции ρ , которая соответствует среднему расстоянию от предкового гаплотипа ко всем производным гаплотипам, включая гипотетические (так называемые медианные векторы, mv) [14]. Для расчета времени дивергенции использовали значение скорости накопления мутаций в гене цитохрома b, равное 0.95% дивергенции за 1 млн. лет; это значение скорости рассчитывали, исходя из времени дивергенции между соболем и лесной куницей, составляющем 1.1 млн. лет (0.5–1.7 млн. лет в 95%-ном доверительном интервале) по результатам байесовского анализа модели молекулярных часов, калиброванных палеонтологическими данными для семейства Mustelidae, как показано в работе [1].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе определены нуклеотидные последовательности длиной 720 пар нуклеотидов гена цитохрома b мтДНК у 17 соболей из популяций Магаданской области, Камчатки и Хабаровского края (табл. 1). Для проведения филогенетического анализа нами использованы также дополнительные данные о нуклеотидных последовательностях этого гена, представленные в базе данных GenBank. Нами проанализированы нуклеотидные последовательности лесной куницы

цы *M. martes* L., каменной куницы *M. foina* и харзы *M. flavigula*, а также добавлены некоторые данные по изменчивости мтДНК соболя *Martes zibellina* L., обитающего в Японии. Все это в совокупности позволило провести филогенетический анализ молекулярных данных в пределах подсемейства Martinae (рис. 1). Межвидовые различия в этом подсемействе (в виде *p*-дистанций, показывающих пропорцию нуклеотидных позиций, по которым различаются сравниваемые последовательности ДНК) варьируют в диапазоне от 3.1% между сободем и лесной куницей до 13.3% между сободем и харзой (табл. 2). Внутривидовая дивергенция нуклеотидных последовательностей соболя в среднем составляет 0.55%, однако интервал различий достаточно широк – от 0 до 1.5%. Это обусловлено существованием двух филогенетических групп мтДНК соболя (рис. 1). Они обозначены как А и ВС. Эти обозначения соответствуют предложенным ранее группировкам соболя, выделенным на основании данных о полиморфизме длины рестриционных фрагментов для нескольких генов мтДНК соболя [2–4]. Дивергенция нуклеотидных последовательностей гена цитохрома *b* в пределах кластера А составляет всего 0.14% (в значениях *p*-дистанций), а в пределах ВС – 0.42%. Кластер ВС дифференцируется на два субкластера – В и С. Различия между кластерами А и В составляют 1.3%, а между А и С – 1.5%. В пределах кластера А также выделяются два субкластера, однако статистическая поддержка их существования невысока (значения бутстреп-индексов менее 50%). Тем не менее в филогеографическом отношении субкластеры А1 и А2 различаются, поскольку субкластер А2 представлен в основном соболями из Хоккайдо; исключение составляют только два образца из Среднеканского района Магаданской области – В35 из окрестностей п. Балыгычан и EF987753 из окрестностей п. Сеймчан. Между тем субкластер А1 представлен соболями из различных районов Северо-Восточной Азии – как Камчатки, так и Хабаровского края и Магаданской области.

Кластеры В и С сформированы в филогенетическом дереве (рис. 1) гаплотипами соболей из Магаданской области и Хабаровского края. Интересно, что особь лесной куницы из Швеции, имеющей гаплотип соболя AF448241 [6], относится к субкластеру В, причем ее гаплотип идентичен таковому у хабаровского соболя 6373. На филогенетическом дереве хорошо видно, насколько удален субкластер В соболя от гаплотипов лесной куницы, что свидетельствует о появлении материнской линии соболя в генофонде лесной куницы исключительно вследствие межвидовой гибридизации, а не парафилиетического происхождения таксона *M. martes* L.

Проведенные ранее исследования изменчивости мтДНК соболя показали, что гаплогруппы А,

Таблица 2. Межвидовые различия в подсемействе куниц Martinae (в % дивергенции нуклеотидных последовательностей гена цитохрома *b*)

	<i>Martes zibellina</i> L.	<i>M. martes</i> L.	<i>M. foina</i>
<i>M. martes</i> L.	3.1		
<i>M. foina</i>	8.5	7.4	
<i>M. flavigula</i>	13.3	12.6	13.0

В и С распространены в популяциях с различными частотами [2, 4]. Так, в популяциях Центральной Камчатки все проанализированные особи относились к гаплогруппе А, в Хабаровском крае (Верхнебуреинский и Лазовский районы) – к гаплогруппам А (33%), В (57%) и С (10%), в интродуцированных популяциях Магаданской области – к гаплогруппам А (63%), В (22%) и С (15%) [4]. Исследования [5, 15] показали, что все проанализированные особи соболя *Martes zibellina* L. с Хоккайдо ($n = 10$) относятся к гаплогруппе А (точнее к А2). Между тем высокий уровень дивергенции между нуклеотидными последовательностями гаплогрупп А и ВС (в среднем, 1.4%) предполагает, что предковый генофонд соболя в какой-то момент времени оказался разделенным на две части, видимо, вследствие покровного оледенения, однако впоследствии по мере потепления две части генофонда воссоединились. По всей видимости, морфологические различия, существовавшие между соболями гаплогрупп А и ВС, до сих пор вносят определенный вклад в современное фенотипическое разнообразие популяций соболей. Об этом может свидетельствовать, например, морфологическое своеобразие камчатского соболя, относимого к отдельному подвиду *M. z. kamtschadalica* и характеризующегося митохондриальными гаплотипами А1 [4, 10]. Между тем гаплотипы А1 сочетаются с гаплотипами из групп В и С в генофонде соболя, обитающего в Хабаровском крае и в Магаданской области и относимого к другому подвиду – *M. z. jakutensis*.

Для того чтобы оценить время разделения митохондриального генофонда соболя на две группы (А и ВС), нами проанализирована медианная сеть гаплотипов соболя в сравнении с гаплотипами лесной куницы (рис. 2). Анализ показал, что гаплотип В является предковым по отношению к гаплотипам С и А, а среднее расстояние от гипотетического предкового гаплотипа (mv_2) до гаплотипов групп С и А составляет 7.4 ± 0.6 мутаций, что примерно соответствует эволюционному времени, равному 1.08 ± 0.09 млн. лет. Анализ медианной сети 20 нуклеотидных последовательностей, относящихся к гаплогруппе А, показал, что эволюционный возраст этого кластера составляет 123 ± 61 тыс. лет. Следует отметить, что производное состояние гаплогруппы С по отношению к



Рис. 1. Байесовское консенсусное филогенетическое дерево, основанное на данных об изменчивости гена цитохрома b мтДНК у представителей подсемейства Martinae. Дерево укоренено относительно нуклеотидной последовательности харзы *M. flavigula* (номер в GenBank AB051235) (на рисунке не приводится). На ветвях указаны значения бутстреп-индексов, превышающие 50%. Кластеры мтДНК соболя указаны латинскими буквами А (А1, А2), В и С. Более детальная информация об исследованных образцах мтДНК соболя приводится в табл. 1.

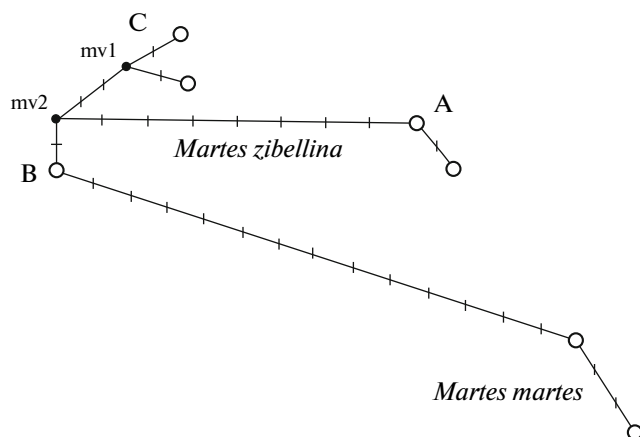


Рис. 2. Медианная сеть гаплотипов гена цитохрома b соболя *M. zibellina* L. в сравнении с лесной куницей *M. martes* L. Показаны филогенетические взаимоотношения между гаплотипами А, В и С соболя и гаплотипами лесной куницы (отмечены кружками); медианные векторы (mv) представляют собой гипотетические гаплотипы. На ветвях сети указано количество мутаций.

более древней группе В представляет интерес, поскольку наиболее высокие частоты группы С зарегистрированы в популяциях соболя Колымского очага — в среднем 20.5% (в интервале от 13 до 40% в различных популяциях) [4]. Отмечалось, что в этих местах аборигенный соболь весь или почти весь был выбит к началу XX в.; по реконструкциям колымский соболь был крупным и темным и отличался фенотипически как от камчатского, так и от более южного буреинского соболя [8]. Таксономический статус колымского соболя не ясен, однако вполне возможно, что гаплогруппа С могла маркировать именно колымский подвид соболя.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что разделение предковой популяции соболя могло произойти в раннем плейстоцене, а экспансия его молодой филогенетической группы А произошла, по всей видимости, в более благоприятном в климатическом отношении промежутке времени в позднем плейстоцене (примерно 120 тыс. лет назад). Для большей детализации генетической истории этого вида необходимо расширение ареала исследований и более подробный анализ изменчивости в пределах филогенетических групп мтДНК.

Авторы выражают признательность Е.А. Дубинину и Н.П. Балмышевой за помощь, оказанную в создании коллекции биологических образцов соболя.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Koepfli K.P., Deere K.A., Slater G.J. et al. Multigene phylogeny of the Mustelidae: resolving relationships, tempo and biogeographic history of a mammalian adaptive radiation // BMC Biol. 2008. V. 6. P. 10.
2. Балмышева Н.П., Соловечук Л.Л. Генетическая изменчивость гена цитохрома b митохондриальной ДНК соболя (*Martes zibellina* L.) магаданской популяции // Генетика. 1999. Т. 35. № 9. С. 1252–1257.
3. Петровская А.В. Генетическая структура популяций соболя *Martes zibellina* L. Магаданской области по данным об изменчивости митохондриальной ДНК // Генетика. 2007. Т. 43. № 4. С. 530–536.
4. Балмышева Н.П., Соловечук Л.Л. Ассоциация мутаций в генах цитохрома b и NADH дегидрогеназы 5/6 митохондриальной ДНК у соболя (*Martes zibellina* L.) // Генетика. 1999. Т. 35. № 12. С. 1681–1686.
5. Kurose N., Masuda R., Siriaronrat B., Yoshida M.C. Intraspecific variation of mitochondrial cytochrome b gene sequences of the Japanese marten *Martes melampus* and the sable *Martes zibellina* (Mustelidae, Carnivora, Mammalia) in Japan // Zool. Sci. 1999. V. 16. P. 693–700.
6. Stone K.D., Cook J.A. Molecular evolution of Holarctic martens (genus *Martes*, Mammalia: Carnivora: Mustelidae) // Mol. Phylogenet. Evol. 2002. V. 24. P. 169–179.
7. Монахов Г.И. Географическая изменчивость и таксономическая структура соболя фауны СССР // Труды ВНИИ охотничьего хозяйства и звероводства. Киров, 1976. Вып. 26. С. 54–86.
8. Павлинов И.Я., Россолимо О.Л. Географическая изменчивость и внутривидовая систематика соболя (*Martes zibellina* L.) на территории СССР // Сб. трудов зоологического музея МГУ. 1979. Т. XVIII. С. 241–256.
9. Anderson E. Quaternary evolution of the genus *Martes* (Carnivora, Mustelidae) // Acta Zool. Fenn. 1970. V. 130. P. 1–132.
10. Дубинин Е.А., Валенцев А.С. К популяционной структуре камчатского соболя // Экология. 2003. Т. 34. № 5. С. 382–386.
11. Девяткин Г.В. Соболь Северо-Востока Азии (реаклиматизация, экология, использование): Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Владивосток: БПИ ДВО РАН, 1993. 14 с.
12. Kumar S., Tamura K., Nei M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment // Brief. Bioinform. 2004. V. 5. P. 150–163.
13. Drummond A.J., Ho S.Y.W., Phillips M.J., Rambaut A. Relaxed phylogenetics and dating with confidence // PLoS Biol. 2006. V. 4. e88.
14. Bandelt H.-J., Forster P., Rohl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies // Mol. Biol. Evol. 1999. V. 16. P. 37–48.
15. Hosoda T., Suzuki H., Harada M. et al. Evolutionary trends of the mitochondrial lineage differentiation in species of genera *Martes* and *Mustela* // Genes Genet. Syst. 2000. V. 75. P. 259–267.

Intraspecific Structure of Sable *Martes zibellina* Inferred from Nucleotide Variation of the Mitochondrial DNA Cytochrome b Gene

B. A. Malyarchuk, A. V. Petrovskaya, and M. V. Derenko

*Institute of the Biological Problems of the North, Russian Academy of Sciences, Magadan, 685000 Russia
e-mail: malyarchuk@ibpn.ru*

A fragment of the mitochondrial DNA (mtDNA) cytochrome b gene was sequenced in sable from Magadan oblast, Khabarovsk krai, and Kamchatka. Using phylogenetic analysis, the presence of two clusters (A and BC), with the divergence value of 1.4%, was demonstrated. Analysis of the cytochrome b gene median networks indicated that split of the ancestral population took place in early Pleistocene (about one Myr ago), while expansion of its more young phylogenetic group A occurred in late Pleistocene, about 120 000 years ago.