

УДК 575.832+599.322.2

**ВНУТРИ- И МЕЖПОПУЛЯЦИОННЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ  
КОНТРОЛЬНОГО РЕГИОНА МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК  
У КРАПЧАТОГО СУСЛИКА (*Spermophilus suslicus*)**

© 2014 г. В. А. Матросова, Л. Е. Савинецкая, О. Н. Шекарова, С. В. Пиванова,  
М. Ю. Русин, И. А. Володин, Е. В. Володина, А. В. Чабовский

Представлено академиком Д.С. Павловым 28.11.2013 г.

Поступило 28.11.2013 г.

DOI: 10.7868/S0869565214120238

Фрагментация и сокращение ареалов часто отражаются на генетической структуре популяций диких животных, затрудняя обмен генами между разными частями ареала, снижая эффективный размер популяции и приводя к возрастанию уровня инбридинга [1]. В небольших разрозненных популяциях влияние дрейфа генов может уменьшать генетическое разнообразие, тем самым ограничивая возможности адаптации к изменениям окружающей среды и повышая риск вымирания локальных популяций [2–4].

Суслики и другие наземные беличьи служат удобной моделью для исследования влияния фрагментации ареала на генетическую структуру популяций. Для разных видов и регионов показано, что трансформация местообитаний и их фрагментация в результате деятельности человека приводят к ограничению потока генов между изолированными популяциями и сокращению генетического разнообразия внутри популяций, что увеличивает риск их вымирания и требует специальных мер по их сохранению [2, 3, 5]. Поддержание генетического разнообразия и устойчивости популяций может быть обеспечено реинтродукцией и обменом особями между изолированными популя-

циями, для чего необходимо знать их генетическую структуру, происхождение, степень внутри- и межпопуляционного полиморфизма [2, 3, 5].

К числу уязвимых видов относится и крапчатый суслик (*Spermophilus suslicus*), населяющий степи и лесостепи России, Украины, Молдовы, частично Польши и Беларуси. Суслики с северо-востока ареала имеют диплоидный набор хромосом  $2n = 34$ ,  $NF = 68$ , в то время как на юго-западе ареала –  $2n = 36$ ,  $NF = 72$  [6]. Хотя ряд авторов выделяют 36-хромосомную форму как отдельный вид [7], в данной работе мы придерживаемся традиционной точки зрения на систематику [8, 9]. В последние десятилетия происходит сокращение численности поселений, местами вид исчез, и сохранились лишь отдельные мелкие колонии с высокой степенью изоляции [10]. В России вид включен в Красные книги Московской, Нижегородской, Брянской, Пензенской и некоторых других областей, в Красные книги Татарстана и Молдавии. В Украине обе формы крапчатого суслика включены в третье издание Красной книги (2009), при этом 34-хромосомная форма имеет статус “Исчезающий”, а 36-хромосомная – “Неоцененный”. В Беларуси и Польше вид также находится под охраной с 2006 и 1984 г. соответственно. В Красном списке МСОП (IUCN Red List) с 1996 по 2008 г. вид имел статус VU – “Уязвимый”, однако с 2008 г. по настоящее время охранная категория неоправданно понижена до NT – “Ближкий к уязвимому”.

Проведенный нами ранее биоакустический анализ популяций из Московской и Липецкой областей выявил значительные межпопуляционные различия в криках тревоги, что позволило предположить наличие и существенных генетических различий между этими изолированными популяциями [11]. Это предположение подтверждается исследованием полиморфизма левого домена контрольного региона мтДНК (310 п.н.)

*Институт молекулярной биологии  
им. В.А. Энгельгардта Российской Академии наук,  
Москва*

*Институт проблем экологии и эволюции  
им. А.Н. Северцова*

*Российской Академии наук, Москва*

*Липецкий государственный педагогический  
университет*

*Институт зоологии им. И.И. Шмальгаузена  
Национальной Академии наук Украины, Киев*

*Московский государственный университет*

*им. М.В. Ломоносова*

*Московский зоопарк*

**Таблица 1.** Характеристики популяций крапчатого суслика.  $N$  – число исследованных особей из популяции;  $N_{\text{hapl}}$  – число обнаруженных гаплотипов;  $N_{\text{uniq}}$  – число уникальных гаплотипов;  $\pi$  – нуклеотидное разнообразие;  $S.E.$  – стандартная ошибка

Популяция	$N$	$N_{\text{hapl}}$	$N_{\text{uniq}}$	$\pi$	( $S.E.$ )
Зарайск	10	1	0	0.000	(0.000)
Липецк	10	1	0	0.000	(0.000)
Мичуринск	10	3	2	0.001	(0.000)
Новосельское	10	5	2	0.005	(0.001)
Озерное	10	4	2	0.009	(0.002)

крапчатого суслика, которое выявило значительный уровень различий между 20 популяциями из разных частей ареала вида [12]. Было обнаружено, что филогеографическая структура в западной части ареала была выражена сильнее, чем в восточной. Все изученные экземпляры имели уникальные гаплотипы, однако из большинства поселений анализировали лишь по одной особи (лишь для четырех поселений – 2–3 особи), что не позволило оценить внутривидовую изменчивость и сопоставить ее с межвидовой. Кроме того, авторы учитывали структуру лишь фрагмента контрольного региона.

Целью данной работы было изучение внутри- и межвидового полиморфизма полного контрольного региона мтДНК для пяти популяций крапчатого суслика Центральной России и Украины.

## МЕТОДЫ

Сбор данных проводили с апреля по август 2005–2013 гг. в период наземной активности сусликов. Объектами исследования были 50 индивидуально меченных взрослых крапчатых сусликов, по 10 особей из пяти изолированных природных популяций. Особей выбирали из массива доступных данных так, чтобы минимизировать шанс включить в анализ близких родственников.

1. “Зарайск” (54°47'68" с.ш., 38°42'23" в.д.): поселение на открытом суходольном лугу с высоким травостоем возле пос. Великое Поле Зарайского р-на Московской обл.

2. “Липецк” (52°36'28" с.ш., 39°26'38" в.д.): поселение на городском кладбище вблизи с. Косыревка Липецкой обл. Кладбище создано на месте сельскохозяйственных земель в 1980 г., на сегодняшний день оно представляет собой усложненный антропогенный ландшафт с преобладанием интродуцентов во флоре.

3. “Мичуринск” (52°51'44" с.ш., 40°47'01" в.д.): последний сохранившийся фрагмент ранее успешного поселения на окраине пос. Дмитриевка Ми-

чуринского р-на Тамбовской обл., на обочине федеральной трассы М-6.

4. “Новосельское” (45°20'44" с.ш., 28°36'33" в.д.): поселение возле с. Новосельское Ренийского р-на Одесской обл. на низком берегу оз. Ялпуг с преобладанием пасквально-рудеральной растительности при умеренной пастбищной нагрузке.

5. “Озерное” (45°25'92" с.ш., 28°40'04" в.д.): поселение возле с. Озерное Ренийского р-на Одесской обл. на высоком сухом берегу оз. Ялпуг в степи с травостоем, сильно выбитым овцами. Два последних поселения были расположены в 12 км друг от друга и были разделены двумя крупными вытянутыми в меридиональном направлении озерами, которые, вероятно, могут служить географическим барьером для сусликов.

Первые три популяции относятся к восточной, а последние две – к западной части ареала крапчатого суслика.

Отлов проводили сетчатыми живоловками, пойманных животных метили пожизненными метками, определяли их пол и возраст, после этого выпускали. Точку поимки фиксировали при помощи спутникового навигатора. Географические дистанции между популяциями рассчитывали как линейные расстояния между ними в километрах на основании GPS-координат в приложении MapSource (табл. 1).

ДНК выделяли из фрагментов мягких тканей (срезов подушечек пальцев), фиксированных в 96%-м этиловом спирте, методом фенол-хлороформной экстракции либо при помощи робота для выделения ДНК Kingfisher® Flex (“Thermo Scientific”, США) и набора Magna DNA Prep (“Лаборатория Изоген”, Россия), согласно рекомендациям производителей.

Для амплификации полного контрольного региона, фланкированного фрагментом гена тРНК-Pro и геном тРНК-Phe (общая длина фрагмента около 1148 п.н.), использовали праймеры MDL1 и H00651 [13]. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в объеме 25 мкл, использовали реактивы компании “Dialat Ltd.” (Россия), 5 пМ каждого из праймеров, 0.1–0.2 мкг ДНК, и ddH<sub>2</sub>O до необходимого объема. Амплификацию проводили по протоколу: 94°C – 1 мин, 62°C – 1 мин, 72°C – 3 мин (30 циклов). Полученные ПЦР-продукты окрашивали бромистым этидием и визуализировали в УФ-свете в 1.5%-м агарозном геле, вырезали и очищали при помощи колонок MinElute Gel Extraction kit (“Qiagen”, Германия). Секвенирование проводили на автоматическом генетическом анализаторе ABI 3730 с использованием набора BigDye v.3.1 (“Applied Biosystems”, США) с каждым из пары внутренних праймеров (разработаны В.Л. Суриным) MDL2D 5'-CCAAATGAC-TATCCCCTACC-3' и MDL3R 5'-GAC-TAATAAGTCCAGCTACA-3'.



**Таблица 2.** Исследованные особи крапчатого суслика и обнаруженные гаплотипы контрольного региона мтДНК. Принадлежность к популяции закодирована первой буквой имени образца: Z – “Зарайск”, L – “Липецк”, M – “Мичуринск”, N – “Новосельское”, O – “Озерное”. m – самец, f – самка. Уникальные гаплотипы показаны жирным шрифтом

Образец	Пол	Гаплотип	Номер NCBI	Образец	Пол	Гаплотип	Номер NCBI
Z147	m	Z1	KF934335	M18	m	M1	KF934360
Z153	m	Z1	KF934336	M19	m	M1	KF934361
Z381	m	Z1	KF934337	M21	m	M1	KF934362
Z412	f	Z1	KF934338	M22	f	M1	KF934363
Z4057	f	Z1	KF934339	M23	f	M1	KF934364
Z4064	m	Z1	KF934340	N14	m	N1	KF934365
Z4066	m	Z1	KF934341	N16	f	N2	KF934366
Z4070	f	Z1	KF934342	N27	f	N1	KF934367
Z4143	m	Z1	KF934343	N48	f	N3	KF934368
Z4144	f	Z1	KF934344	N52	m	N3	KF934369
L34	f	L1	KF934345	N56	m	N2	KF934370
L35	f	L1	KF934346	N211	f	N2	KF934371
L36	m	L1	KF934347	N213	m	N3	KF934372
L37	m	L1	KF934348	N222	m	<b>N4</b>	KF934373
L38	m	L1	KF934349	N226	m	<b>N5</b>	KF934374
L39	f	L1	KF934350	O101	f	<b>O1</b>	KF934375
L46	m	L1	KF934351	O103	f	<b>O2</b>	KF934376
L47	m	L1	KF934352	O105	m	<b>O3</b>	KF934377
L48	f	L1	KF934353	O108	m	O4	KF934378
L49	m	L1	KF934354	O109	f	O4	KF934379
M11	m	M1	KF934355	O111	f	O4	KF934380
M13	f	M1	KF934356	O112	f	O4	KF934381
M15	m	<b>M2</b>	KF934357	O113	f	O2	KF934382
M16	f	<b>M3</b>	KF934358	O114	f	O4	KF934383
M17	f	M1	KF934359	O201	m	O4	KF934384

**Таблица 3.** Матрица генетических и географических дистанций между исследованными популяциями крапчатого суслика

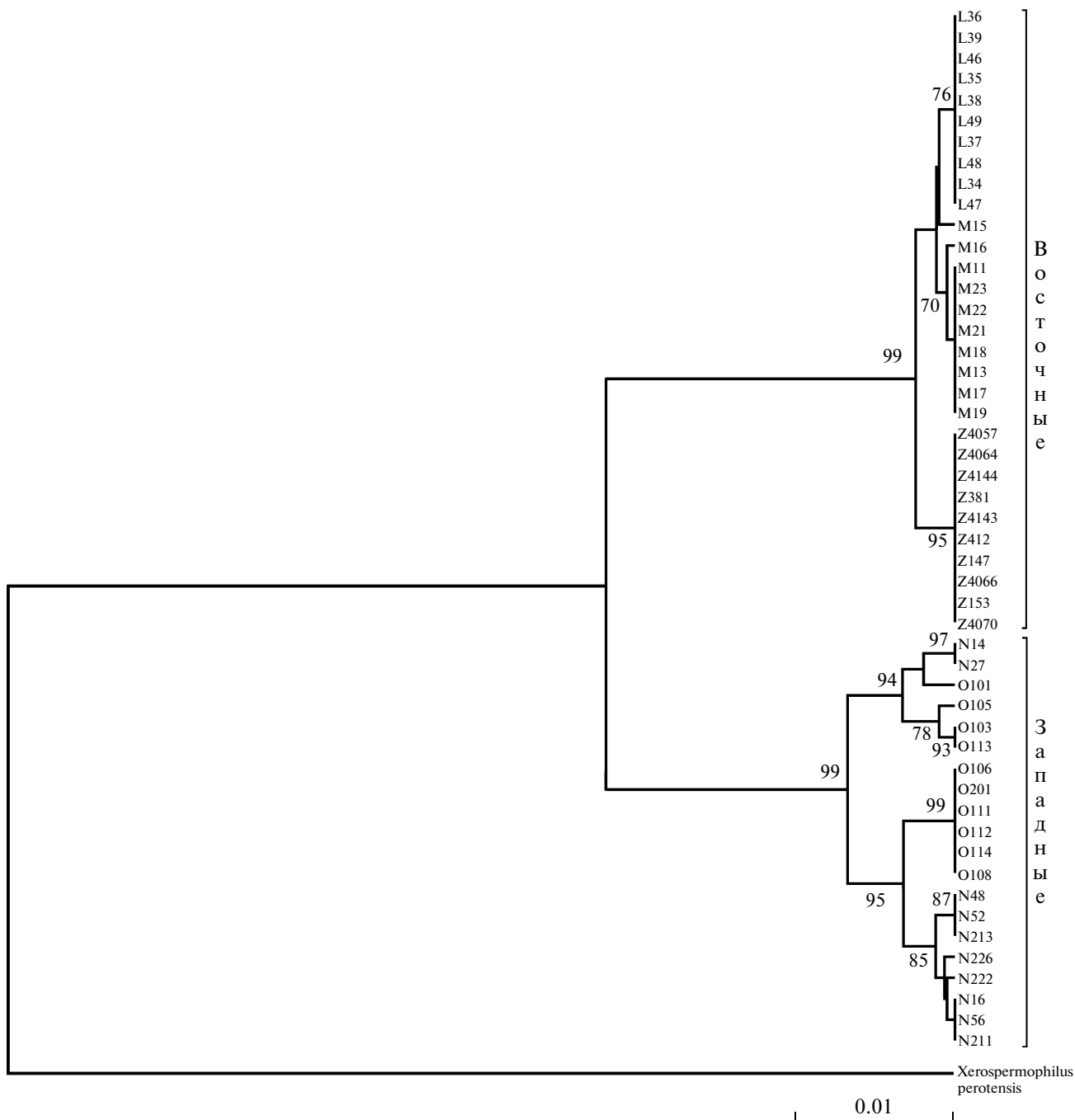
Популяция	Зарайск	Липецк	Мичуринск	Новосельское	Озерное
Зарайск		0.005	0.005	0.049	0.048
Липецк	249		0.002	0.045	0.043
Мичуринск	255	95		0.046	0.045
Новосельское	1274	1130	1217		0.010
Озерное	1262	1119	1206	12	

Цифры выше диагонали отражают нуклеотидные различия между популяциями ( $K_2P$ -distance). Цифры ниже диагонали показывают расстояние между популяциями в километрах.

Один и тот же гаплотип никогда не встречался за пределами одной популяции.

Вся выборка особей разделилась на две большие группы, объединяющие соответственно три восточные (“Зарайск”, “Липецк” и “Мичуринск”) и две

западные (“Новосельское” и “Озерное”) популяции (рис. 2). Структура восточных популяций была слабо выражена: генетические расстояния между особями в пределах популяций “Зарайск” и “Липецк” оказались равны нулю, а в популяции “Мичуринск” встречались лишь единичные за-



**Рис. 2.** Филогенетическое дерево гаплотипов контрольного региона мтДНК крапчатого суслика (UPGMA). Цифры у ветвей – индексы бутстрепа (1000 повторов), указаны только индексы более 70%. Номера образцов соответствуют таковым в табл. 2.

мены нуклеотидов (табл. 1, рис. 2). Внутрипопуляционная изменчивость западных популяций “Новосельское” и “Озерное” была значительно выше, чем восточных (среди их особей выделялись различные филогенетические линии). Межпопуляционные генетические расстояния были больше внутривидовых для всех популяций, включая высоко вариабельные соседние популя-

ции “Новосельское” и “Озерное” (табл. 2 и 3). Генетическая дистанция между всеми восточными и всеми западными популяциями составила 4.4%.

Генетические расстояния между географически удаленными популяциями оказались значительно выше, чем между изолированными популяциями из одного или из соседних регионов (табл. 3). Нуклеотидные различия накапливаются

постепенно с увеличением дистанции между популяциями в результате дрейфа генов. Очевидно, что этот эффект усиливается фрагментацией ареала, наличием экологических или физико-географических барьеров, о чем говорят значительные межпопуляционные различия соседних, но изолированных популяций.

Анализ изменчивости полного контрольного региона мтДНК показал, что суслики с востока ареала демонстрируют существенно более низкое генетическое разнообразие, нежели суслики из западных популяций. Таким образом, наши результаты хорошо согласуются с данными недавнего исследования полиморфизма левого домена контрольного региона крапчатых сусликов из разных частей ареала [12].

Обедненное генетическое разнообразие исследованных восточных популяций позволяет предположить, что они менее жизнеспособны, чем западные. Все они сильно фрагментированы и находятся под сильным антропогенным прессом. Исследованные западные популяции из украинской Бессарабии более благополучны как по генетическому разнообразию, так и по численности особей и площади колоний.

Молекулярно-генетические методы широко применяют для решения различных природоохранных задач, в том числе для выбора популяций, пригодных для реинтродукции животных. Популяция-донор должна быть максимально близка генетически к восстанавливаемой популяции.

Очевидно, что более полную информацию о филогеографической структуре популяций может дать лишь комплексный анализ как геномных (ядерной и митохондриальной ДНК), так и фенотипических (в том числе акустических) маркеров. Требуется дальнейшее увеличение числа исследуемых популяций и использование более вариабельных геномных маркеров, таких как микросателлиты из ядерной ДНК.

Авторы выражают благодарность сотрудникам ЦКП “ГЕНОМ” при ИМБ РАН, на базе которого выполнялась работа, П.А. Сорокину и Е.Н. Соловьевой за помощь в выделении ДНК. За помощь в сборе материала благодарим сотрудников лаборатории медицинской эпизоотологии УНИПЧИ им. И.И. Мечникова (Одесса, Украина), а также

А. Рашевскую и Ю. Милобога. Авторы искренне признательны В.С. Лебедеву, А.А. Банниковой, О.А. Ермакову, С.В. Титову, Н.А. Пояркову, Е.Н. Соловьевой, В.С. Артамоновой и И.В. Палько за методические консультации и М.В. Холодовой за рецензирование рукописи и ценные замечания.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты 12–04–00260, 12–04–31274) и программы фундаментальных исследований Президиума РАН “Живая природа: современное состояние и проблемы развития”, подпрограмма “Динамика и сохранение генофондов”.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Garner A., Rachlow J.L., Hicks J.F. // Conservation Biol. 2005. V. 19. № 4. P. 1215–1221.
2. Frankham R. // C.R. Biol. 2003. V. 326. P. 22–29.
3. Ricanova S., Bryja J., Cosson J.F., et al. // Conservation Genet. 2011. V. 12. P. 1115–1129.
4. Титов С.В., Савинецкая Л.Е., Чабовский А.В. // ДАН. 2009. Т. 429. № 2. С. 283–285.
5. Ochoa A., Gasca J., Ceballos G.J., et al. // J. Mammal. 2012. V. 93. № 4. P. 1061–1074.
6. Воронцов Н.Н., Ляпунова Е.А. // Бюл. МОИП. Отд. биол. Т. 75. № 3. С. 112–126.
7. Загороднюк М.В., Федорченко А.А. // Вестн. зоологии. 1995. № 5/6. С. 49–58.
8. Огнев С.И. Звери СССР и прилежащих стран. М.; Л.: Изд -во АН СССР, 1947. Т. 5. 810 с.
9. Mammal Species of the World. A Taxonomic and Geographic Reference. D.E. Wilson, D.M. Reeder Eds. 3rd ed. Baltimore: John Hopkins Univ. Press, 2005. 2142 p.
10. Шекарова О.Н. // Бюл. МОИП. Отд. биол. 2006. Т. 111. № 5. С. 90–95.
11. Матросова В.А., Пиванова С.В., Савинецкая Л.Е. и др. // Зоол. журн. 2012. Т. 91. № 4. С. 453–463.
12. Ермаков О.А., Сурин В.Л., Титов С.В. // Изв. ПГПУ им. В.Г. Белинского. 2011. Т. 25. С. 176–180.
13. Ермаков О.А., Сурин В.Л., Титов С.В. и др. // Генетика. 2002. Т. 38. № 7. С. 950–964.
14. Hall T.A. // Nucleic Acids Symp. Ser. 1999. V. 41. P. 95–98.
15. Tamura K., Peterson D., Peterson N., et al. // Mol. Biol. and Evolut. 2011. V. 28. P. 2731–2739.