ГЕНЕТИКА, 2018, том 54, № 10, с. 1162–1176

ГЕНЕТИКА ЖИВОТНЫХ

УДК 575.86:599.323.4

ФИЛОГЕОГРАФИЯ ОБЫКНОВЕННОЙ ПОЛЕВКИ *Microtus arvalis* (Rodentia, Arvicolinae) ФОРМЫ obscurus: НОВЫЕ ДАННЫЕ ПО ИЗМЕНЧИВОСТИ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК

© 2018 г. П. А. Сибиряков[1, *], Н. Н. Товпинец[2], Т. А. Дупал[3], В. Л. Семериков[1], Л. Э. Ялковская[1], Е. А. Маркова[1]

[1]Институт экологии растений и животных Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург 620144 Россия

[2]Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Крым и городе Севастополе, Симферополь 395034 Россия

[3]Институт систематики и экологии животных Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск 630091 Россия

**e-mail: p_sibiryakov@rambler.ru*

Поступила в редакцию 16.11.2017 г.

На основании данных об изменчивости двух маркеров – гена цитохрома *b* (1143 пн) и фрагмента контрольного региона митохондриальной ДНК (800 пн) – проанализировано генетическое разнообразие обыкновенной полевки *Microtus arvalis* Pall., 1778 формы obscurus. Изучено 145 особей, отловленных в 39 локалитетах от Крымского п-ова на западе до северного Алтая на востоке. По результатам анализа последовательностей гена цитохрома *b* все особи *M. arvalis* формы obscurus из рассматриваемых регионов отнесены к ранее выделенной Сино-Русской кладе, распространенной в основной части ареала формы obscurus. По объединенным последовательностям двух маркеров мтДНК выявлена внутренняя структура Сино-Русской клады и выделены две субклады – Крымская и Евразийская. Родственные гаплотипы в Евразийской субкладе формируют несколько географически локализованных групп: Вятско-Уральскую, Поволжско-Уральскую, Южно-Уральскую, Южное Предуралье 1 и Южное Предуралье 2. Группы объединены друг с другом через широко распространенное множество слабодифференцированных гаплотипов, встречающихся от Предуралья до Западной Сибири. Два гаплотипа с Северного Алтая и северных предгорий Алтая включены в Евразийскую субкладу, но удалены друг от друга и от гаплотипов других групп на дистанции, сопоставимые с межгрупповыми для данной субклады. Результаты демографического анализа позволяют сделать вывод, что история Сино-Русской клады *M. arvalis* формы obscurus имеет региональную специфику. Гаплотипы, обнаруженные в семи локалитетах на п-ове Крым, вероятнее всего, представляют собой результат единовременной экспансии, тогда как для Евразийской субклады можно предполагать несколько последовательных волн экспансии.

Ключевые слова: Misrotus arvalis, филогеография, митохондриальная ДНК, Крым, Урал, Алтай.

DOI: 10.1134/S0016675818100132

Обыкновенная полевка *Microtus arvalis* s. str. ($2n = 46$) – широко распространенный в Северной Евразии вид, принадлежащий к группе таксонов разной степени дивергенции, ранее известных как единый политипический вид *M. arvalis* s. l., но впоследствии разделенных на основании кариологических и гибридологических данных [1, 2]. Вид *M. arvalis* s. str. представлен двумя парапатрическими формами, между которыми существует зона контакта: западная форма — arvalis и восточная — obscurus. Формы *M. arvalis* s. str. описаны во второй половине XX в. на основании данных о различии их кариотипов: при равном числе хромосом в диплоидном наборе формы различаются по суммарному числу хромосомных плеч [1, 3]. Таксономический статус двух форм обыкновенной полевки является дискуссионным, разными авторами они рассматриваются как хромосомные формы в рамках одного вида [1, 2, 4, 5], полувиды [6] или виды [7, 8]. Вне зависимости от того, какой концепции вида придерживаются авторы, во всех работах признается достаточно высокий уровень генетической дивергенции двух криптических форм обыкновенной полевки при сохранении способности к успешной гибридизации в естественных условиях.

Результаты филогеографического анализа [8–11] показали, что история формирования современных ареалов форм arvalis и obscurus была различной. Несмотря на то, что каждая из выделенных форм за-

нимает приблизительно половину видового ареала, для формы arvalis описаны шесть митохондриальных линий, а для формы obscurus – две линии. В зоне контакта форм arvalis и obscurus, расположенной на территории Восточно-Европейской равнины, происходит их современная гибридизация [6, 12 и т.д.] и, по последним данным [13], интрогрессия митохондриальной и ядерной ДНК.

К настоящему моменту реконструирована филогеографическая структура *M. arvalis* s. str. в западной части ареала [8–11, 14–16]. Высказаны предположения, что наиболее вероятными регионами происхождения всех современных митохондриальных линий, относимых к форме arvalis, являются центральная Европа [10] либо Карпатский и Балканский рефугиумы [15]. Данные реконструкции базируются преимущественно на результатах анализа последовательностей гена цитохрома *b* (цит*b*) митохондриальной ДНК (мтДНК). Использование частичной последовательности контрольного региона мтДНК (КР мтДНК) (≈300 пн) показало принципиальное сходство полученных результатов с данными по изменчивости цит*b* [10, 14], при этом совместный анализ последовательностей двух маркеров при филогенетических реконструкциях позволил детализовать внутригрупповую структуру одной из митохондриальных линий, распространенных на территории ареала формы arvalis [14]. Анализу изменчивости мтДНК *M. arvalis* s. str. формы obscurus на данный момент посвящены две работы [8, 17]. Показано, что в пределах ареала формы obscurus существуют две митохондриальные клады – Средневосточная (Middle East по [17], включая South-Caucasian по [8]) и Сино-Русская. В качестве возможного региона происхождения последней рассматривали п-ов Крым или северный Алтай [8].

Исследования, посвященные филогенетическому и филогеографическому анализу, проводили с использованием двух маркеров мтДНК – цит*b* [8–11, 14, 15, 17] и КР мтДНК [10, 14]. Оба маркера широко используются для филогенетических реконструкций и являются самостоятельными функциональным элементами мтДНК: цит*b* кодирует трансмембранный белок цитохром *b*, являющийся частью комплекса III дыхательной цепи митохондрии [18], КР мтДНК – некодирующий участок мтДНК, так же называемый D-петля, содержащий точку начала репликации тяжелой цепи мтДНК [19].

В нашей работе мы представляем новые данные по изменчивости мтДНК *M. arvalis* s. str. формы obscurus из трех регионов в пределах области распространения Сино-Русской клады – п-ов Крым, Урал и прилежащие равнины, а также Северный Алтай.

Целью данной работы является описание генетического разнообразия, филогенетических взаимоотношений и географического распределения гаплотипов митохондриальной ДНК *M. arvalis* s. str формы obscurus и последующая реконструкция истории формирования современного генетического разнообразия популяций *M. arvalis* s. str. формы obscurus в центральной части Северной Евразии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материал. Образцы мышечной ткани (скелетная и/или сердечня мускулатура) получены от 172 особей *M. arvalis* s. l., отловленных в 40 локалитетах в 2008–2016 гг. (см. Приложение, табл. 1, 2 – Приложение размещено в электронной версии журнала; рис. 1). Поскольку исследуемые территории находятся в зоне симпатрии *M. arvalis* s. str. и ее вида-двойника *M. rossiaemeridionalis* Ognev, 1924, для всех образцов проведена видовая идентификация по маркерам ядерной ДНК [20]. Из 172 особей 145 определены как *M. arvalis* s. str. и использованы для решения поставленных в работе задач. Остальные 27 особей идентифицированы как *M. rossiaemeridionalis*.

Для 145 особей *M. arvalis* s. str. были получены полные последовательности (1143 пн) цит*b* и для 137 из них получены частичные последовательности (800 пн) КР мтДНК (номера в базе данных GenBank: MG702966–MG703237) (Приложение, табл. 1). В связи с различиями в сохранности ДНК в лабораторных образцах (см. раздел "Методы лабораторной работы") для 8 из 15 особей *M. arvalis* s. str. с п-ова Крым на данный момент не получены последовательности КР мтДНК.

Наряду с собственными материалами в анализ включены опубликованные данные по *M. arvalis* s. str. формы obscurus – последовательности гена цит*b* от 62 особей [8, 9, 17, 21] (GenBank: AY220760–65; FR865393–429; KF839584–90; KX581042–52) и КР мтДНК от 1 особи [22] (GenBank: KP013595) (Приложение, табл. 1 и 2; рис. 1). В качестве внешних групп при проведении филогенетических реконструкций использовали последовательности мтДНК *M. arvalis* s. str. формы arvalis [9, 10] (GenBank: AY220766,74,77,88; AM991028,30,43,49,70, 79) (Приложение, табл. 1), *M. rossiaemeridionalis* [23, 24] (GenBank: Q015676; AY513819,21) (Приложение, табл. 1), *M. ilaeus* Thomas, 1912 (=*M. kirgisorum* Ognev, 1950) [24] (GenBank: AY513809–10) и *M. socialis* Pall., 1773 [24] (GenBank: AY513829–31). Номенклатура полевок приведена по данным последней сводки по систематике млекопитающих России [5].

Методы лабораторной работы. Выделение тотальной ДНК осуществляли из образцов мышечной ткани, зафиксированных в 96%-ном этаноле методом солевой экстракции [29, 30].

Для видовой диагностики *M. arvalis* s. str. и *M. rossiaemeridionalis* использовали методику

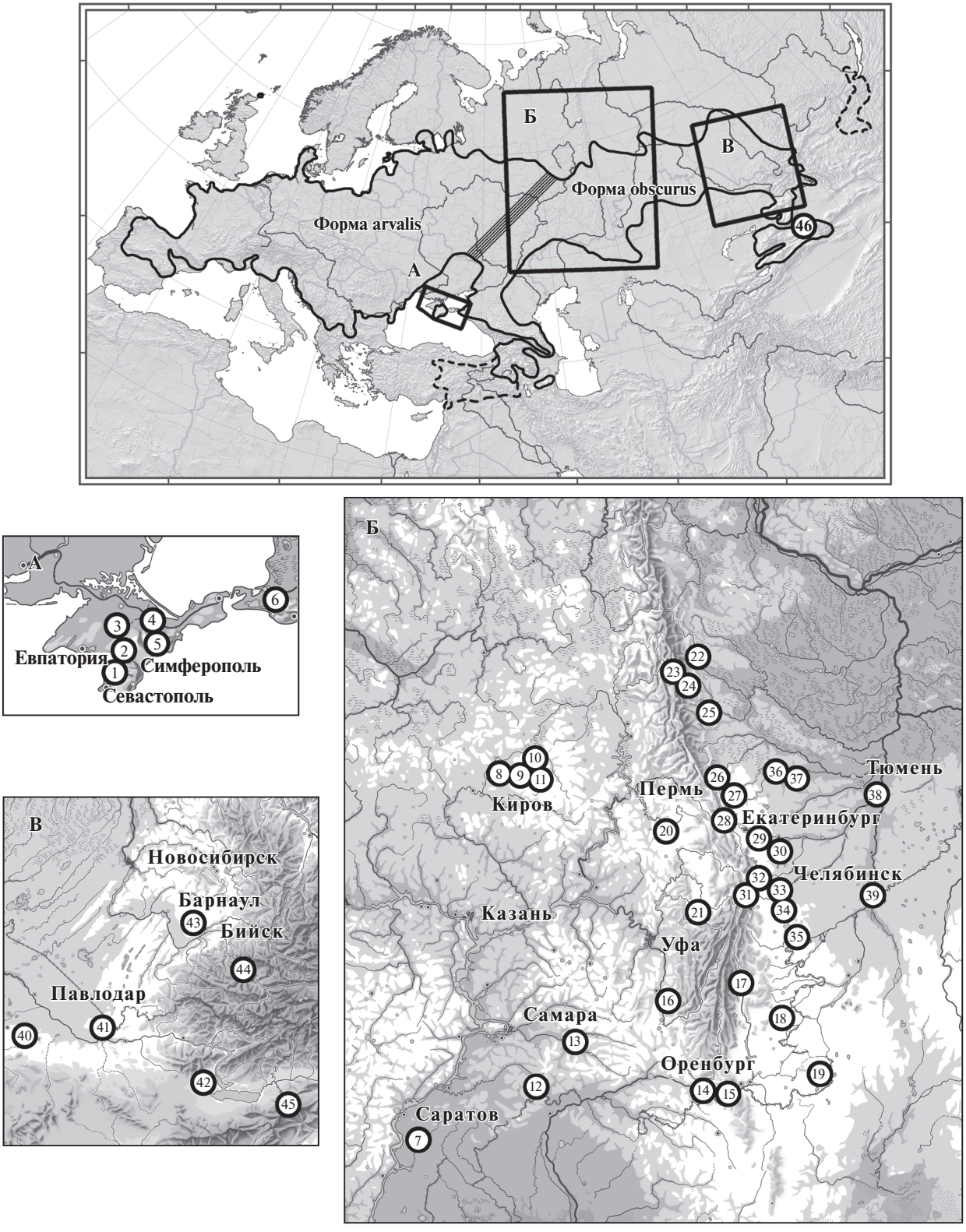

Рис. 1. Ареал *M. arvalis* s. str. (по: [25] с дополнениями по: [17, 26–28]) и точки сбора образцов *M. arvalis* s. str. формы obscurus. Карта вверху – основной ареал *M. arvalis* s. str. (сплошная обводка), участки ареала *M. arvalis* s. l., где присутствие *M. arvalis* s. str. не подтверждено, но возможно [25, 28] (пунктир) и зона контакта форм arvalis и obscurus (штриховка). А–В – регионы, в которых проводили сбор материала: А – Крымский п-ов, Б – Урал и прилежащие равнины, В – юго-восток Западной Сибири и северный Алтай. 1–46 – точки сбора образцов (см. Приложение, табл. 1 и 2 – электронная версия журнала).

ПЦР идентификации [20] в соответствии с рекомендованным протоколом.

Для проведения ПЦР и последующего секвенирования участков мтДНК использовали следующие праймеры: цит*b* – L7, L8, H12 и H6 [31]; КР мтДНК – Pro+, Phe–, micro8+, micro4– [32]. Условия проведения ПЦР и температурные протоколы для использованных пар праймеров приведены в Приложении, табл. 3.

В случае удовлетворительной сохранности ДНК и возможности амплификации фрагментов длиной 1200 пн ПЦР участка, содержащего цит*b*, проводили с использованием пары праймеров L7 и H6 с последующим секвенированием в обоих направлениях. При неуспешной амплификации фрагментов длиной 1200 пн проводили две ПЦР с парами праймеров L7-H12 и L8-H6 с последующим секвенированием каждого ПЦР продукта с праймеров L7 и H6 соответственно. ПЦР участка, содержащего КР мтДНК, проводили только в случае доступности для амплификации фрагментов длиной 1000 пн, что было связано с расположением мест отжига праймеров Pro+, Phe–, micro4– и micro8+ [32] и невозможностью амплификации двух перекрывающихся фрагментов меньшей длины при использовании указанных четырех праймеров, как было сделано в случае с участком, содержащим цит*b*. Для проведения реакции секвенирования использовали наборы “Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit” V. 3.1 (Applied Biosystems, USA) и “BrightDye® Terminator Cycle Sequencing Kit” (NimaGen, Netherlands) по методикам производителей. Детекцию результатов секвенирования проводили на генетическом анализаторе ABI Prism 3130 (Applied Biosystems, USA) в Институте экологии растений и животных УрО РАН и Центре детской онкологии и гематологии ОДКБ № 1, г. Екатеринбург.

Методы анализа данных. Анализ хроматограмм проводили с использованием программы BioEdit v. 7.2.0 (4.30.2013) [33]. Выравнивание последовательностей, расчет генетических дистанций и построение филогенетических деревьев методами ближайшего соседа (Neighbor joining – NJ) и максимального правдоподобия (Maximum likelihood – ML) проводили в программе MEGA v. 6 [34]. Построение филогенетических деревьев с использованием Байесова анализа (Bayesian inference – BI) – MrBayes v. 3.2.2 [35]. Поиск оптимальных моделей эволюции нуклеотидных последовательностей – MrModeltest 2.3 [36]. Построение медианных сетей (Median-Joining Networks – MJN) – Network v. 5.0.0.0 [37]. Получение данных о генетическом разнообразии нуклеотидных последовательностей и расчет тестов на селективную нейтральность – Arlequin v. 3.1 [38] и DnaSP v. 5.10 [39]. Оценка конгруэнтности маркеров проведена с использованием теста на однородность данных (HOMPART) [40] в программном пакете PAUP v. 4.0*b*10 [41].

При построении филогенетических деревьев методом NJ для расчета внутри и межгрупповых дистанций использовали трехпараметрическую модель Тамуры (T3P) [42]. Для построения дерева методом ML по последовательностям цит*b* и цит*b* + КР была выбрана общая реверсионная модель (GTR) [43] с пропорцией инвариантных сайтов (+I) и нормированием по гамма-распределению (+G). При реконструкции филогенетического дерева методом BI по последовательностям цит*b* использовали комплексный подход с выбором модели для каждой из трех позиций в кодоне отдельно: для первой позиции – модель Кимуры (K80) [44] +I; для второй позиции – модель Хесегавы, Кишино, Яно (HKY) [45]; для третьей позиции – GTR+G. При реконструкции филогенетического дерева методом Байесова анализа по последовательностям цит*b* + КР также использовали комплексный подход с выбором модели для каждой из трех позиций в кодоне цит*b*, и для КР мтДНК отдельно: для первой позиции – K80; для второй позиции – HKY; для третьей позиции – GTR+G; для КР мтДНК – GTR+I+G. При построении филогенетических деревьев методами ML и NJ по последовательностям цит*b* и цит*b* + КР статистическая проверка топологии деревьев была проведена методом бутстреп-анализа (1000 циклов). При построении деревьев методом BI осуществляли одновременный запуск двух параллельных анализов, состоящих из 4 цепей Маркова, каждый на 10000000 циклов с сохранением данных о каждом 500-м цикле и последующим исключением данных о первых 5001 записанных циклах. Различия в выборе моделей для построения деревьев методами ML и BI связаны с невозможностью задания комплексной модели для построения филогенетического дерева методом ML.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При анализе последовательностей цит*b* *M. arvalis* s. str. формы obscurus, полученных в данной работе, выявлено 78 гаплотипов, из которых 70 описаны впервые. С учетом представленных ранее, общее число гаплотипов цит*b* формы obscurus – 112. Число полиморфных сайтов в цит*b* – 159, из них 84 информативны для парсимонического анализа, замены в 30 являются несинонимичными. При исключении из анализа последовательностей, отнесенных к Средневосточной кладе, число гаплотипов составило 101, полиморфных сайтов – 127, 52 из которых информативны для парсимонического анализа, и замены в 25 сайтах являются несинонимичными.

При анализе последовательностей КР мтДНК *M. arvalis* s. str. формы obscurus было выявлено 77

гаплотипов, из которых 76 впервые описаны в данной работе. Число полиморфных сайтов в КР мтДНК – 71, из них в двух найдены однонуклеотидные вставки/делеции, и 63 сайта были информативны для парсимонического анализа.

При анализе последовательностей цит*b* + КР *M. arvalis* s. str. формы obscurus, содержащих два маркера, впервые описано 98 гаплотипов. Число полиморфных сайтов – 168, из них в двух сайтах найдены однонуклеотидные вставки/делеции, 95 сайтов информативны для парсимонического анализа.

Филогенетическая реконструкция по последовательностям гена цитохрома b

По результатам филогенетической реконструкции с использованием в качестве внешней группы последовательностей *M. arvalis* s. str. формы arvalis, *M. rossimeridionalis*, *M. ilaeus* и *M. socialis* показано, что все гаплотипы цит*b* *M. arvalis* s. str. формы obscurus кластеризуются в две клады: Средневосточную и Сино-Русскую. Все гаплотипы цит*b*, описанные в ходе выполнения данной работы, включены в Сино-Русскую кладу (Приложение, рис. 1).

По результатам анализа филогенетического дерева в пределах Сино-Русской клады могут быть выделены несколько групп, среди которых пять имеют достаточно четкую географическую локализацию: I – п-ов Крым; II – от Волги на западе до Южного и Среднего Урала на востоке; III – северо-западные провинции Китая; IV – группа, представленная в локалитетах юга Уральского региона от участка Оренбургского заповедника Таловская степь (юго-запад Оренбургской обл.) на западе до п. Звериноголовское Курганской обл. (пойма р. Тобол) на востоке; V – группа из четырех гаплотипов, встреченных в локалитетах Кировской обл. (северо-западная часть области распространения *M. arvalis* s. str. формы obscurus).

Результаты анализа медианной сети (Приложение, рис. 2) подтверждают наличие пяти указанных групп в пределах Сино-Русской клады. Так же результаты анализа медианной сети показывают, что три из пяти выделенных групп (I, II и III) дифференцированы друг от друга и от других последовательностей значительно сильнее, чем группы IV и V.

Филогенетическая реконструкция по последовательностям контрольного региона мтДНК

Филогенетическое дерево, построенное на основании имеющихся последовательностей КР мтДНК (800 пн) Сино-Русской клады *M. arvalis* s. str. формы obscurus (не представлено), позволяет выделить в пределах клады две группы: 1 – включает гаплотипы, обнаруженные только на п-ове Крым и не встреченные в других регионах; 2 – все остальные последовательности КР мтДНК, слабо дифференцированные друг от друга, не формирующие выраженной структуры при построении филогенетического дерева и распространенные от Таманского п-ова до Алтая.

Крымская группа гаплотипов КР мтДНК соответствует группе I, выделенной на основании данных по цит*b*. Объединения гаплотипов КР мтДНК, соответствующих группам II, IV, V, выделенным на основании данных по последовательностям цит*b*, не отмечено. Отличие между последовательностями мтДНК, отнесенными по результатам анализа цит*b* к группе II, и ближайшими к ним последовательностями мтДНК, отнесенными к Сино-Русской кладе, сокращается с 5–9 замен при анализе цит*b* до 1–2 замен при анализе КР мтДНК. Вопрос о степени дифференциации животных из северо-западного Китая (группа III) по КР мтДНК остается открытым из-за отсутствия последовательностей, доступных для анализа.

Филогенетическая реконструкция по результатам совместного анализа двух маркеров мтДНК

Предварительно был проведен анализ на конгруэнтность двух рассматриваемых митохондриальных маркеров. Результаты теста на однородность данных (HOMPART, Paup) оказались незначимы ($p = 0.761$), что позволяет использовать их вместе при проведении филогенетической реконструкции.

Проведенный анализ показал, что в пределах Сино-Русской клады возможно выделение шести групп гаплотипов, в разной степени дифференцированных друг относительно друга (рис. 2). При этом анализ как филогенетического дерева (рис. 2), так и медианной сети (рис. 3) показывает, что наиболее удаленной от остальных является Крымская группа гаплотипов. Основываясь на существенной дистанции, отделяющей эту группу от остальных гаплотипов Сино-Русской клады на медианной сети, нами выделены две субклады в пределах Сино-Русской клады – Крымская и Евразийская (рис. 2, 3).

В пределах Евразийской субклады могут быть выделены несколько групп гаплотипов (рис. 2, 3). Вятско-Уральская группа включает все последовательности мтДНК, отнесенные к группе V, выделенной по результатам анализа цит*b* (Кировская обл.), а также часть гаплотипов от особей с территории Северного, Среднего и Южного Урала. Южно-Уральская группа включает последовательности группы IV, выделенной по результатам анализа цит*b*, и часть ранее недифференцированных последовательностей от особей с территории Южного Урала. Поволжско-Уральская группа

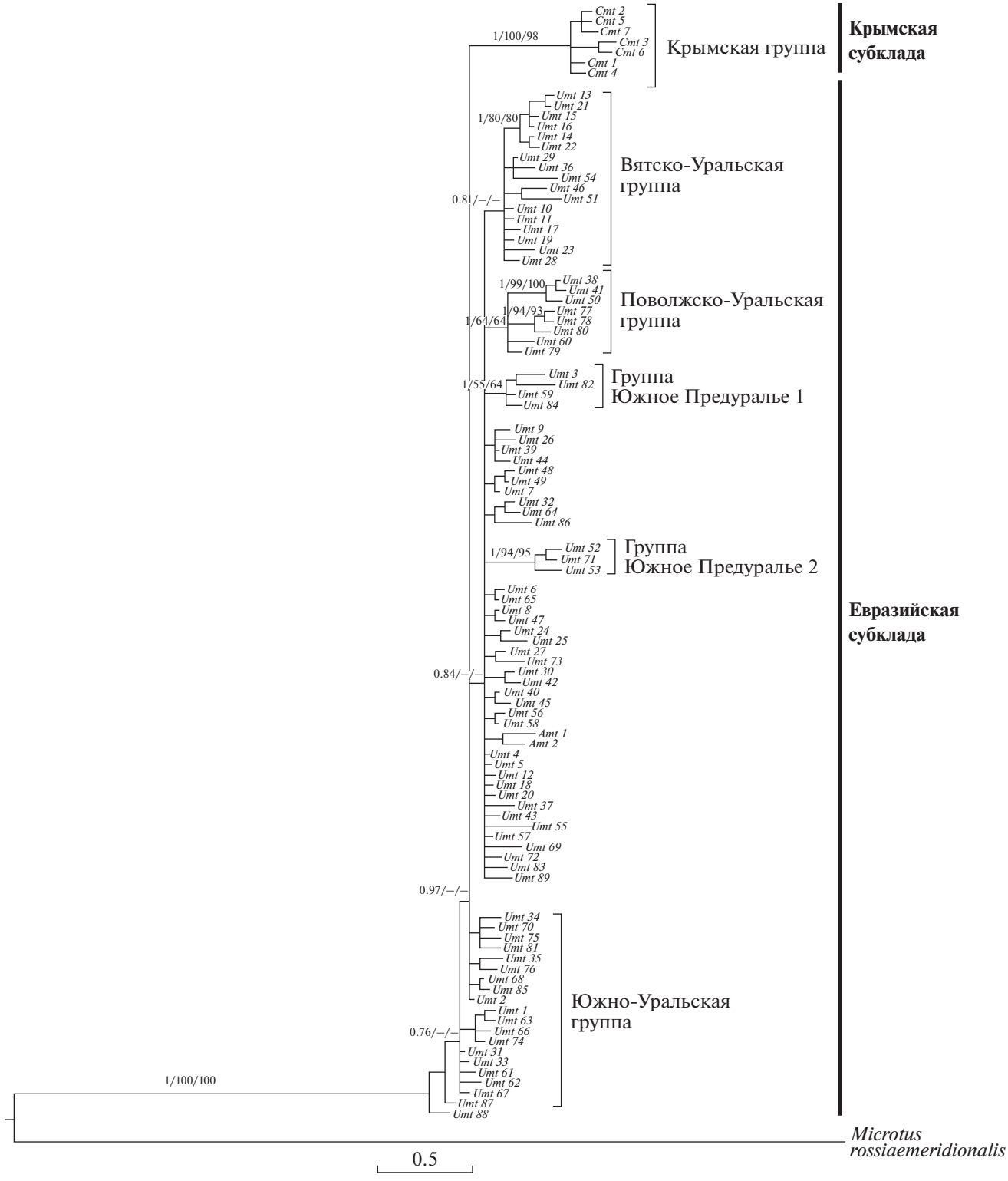

Рис. 2. Филогенетическое дерево, построенное по последовательностям цит*b* + КР (1943 пн) Сино-Русской клады *M. arvalis* s. str. формы obscurus (топология дерева, построенного методом BI). Значения над ветвями – постериорные вероятности BI >0.7/бутстреп-поддержки ML >50/бутстреп поддержки NJ >50. Указаны субклады Сино-Русской клады и группы в пределах Евразийской субклады (пояснение в тексте).

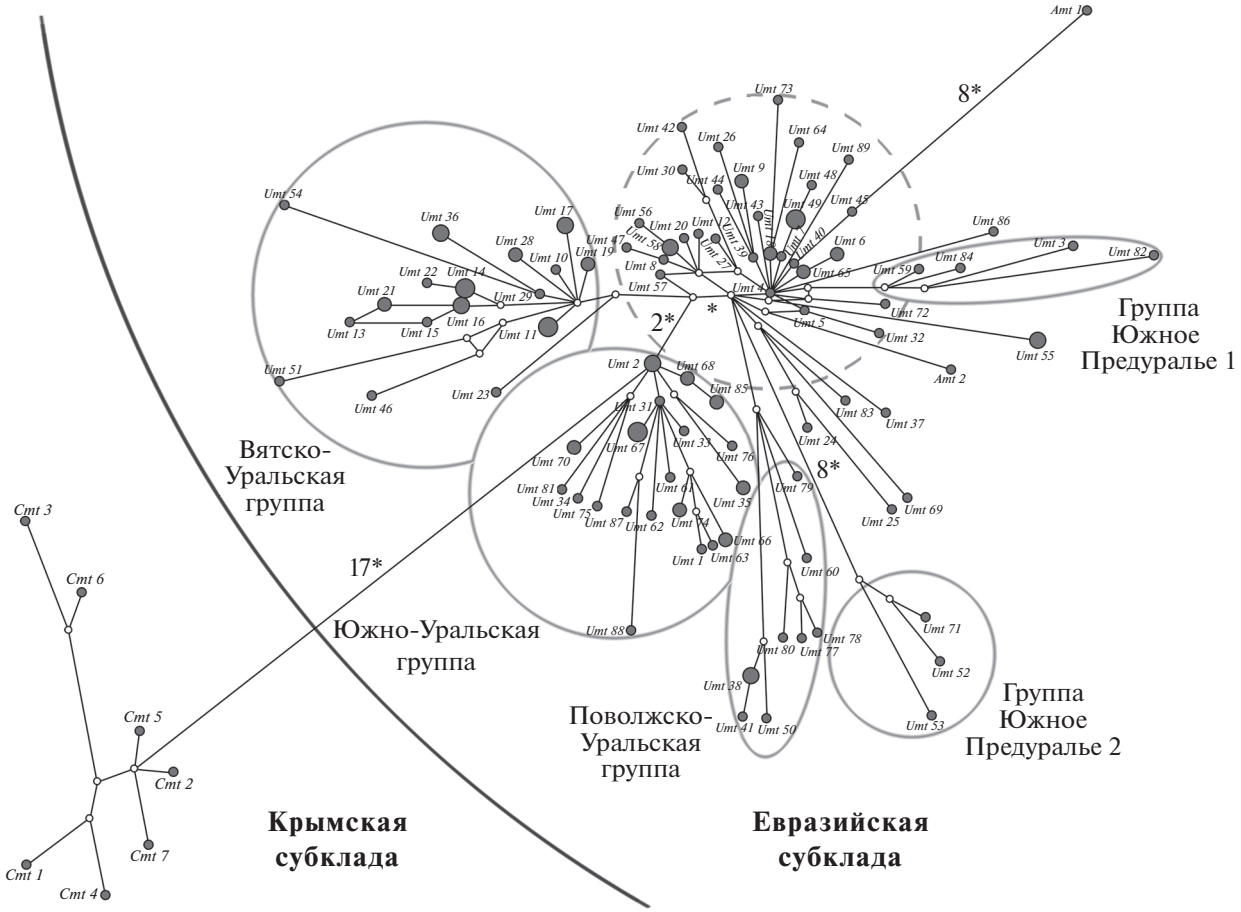

Рис. 3. Медианная сеть (MJN) гаплотипов цит*b* + КР (1943 пн) Сино-Русской клады *M. arvalis* s. str. формы obscurus. Серые точки – гаплотипы; незакрашенные точки – медианные векторы; длина ветвей эквивалентна числу замен между гаплотипами (минимальная длина ветви равняется одной замене), диаметр серых точек эквивалентен числу одинаковых последовательностей, отнесенных к конкретному гаплотипу. Сплошные эллипсы – группы родственных гаплотипов в пределах Евразийской субклады (см. текст); пунктирная линия – множество гаплотипов, занимающих связующее положение между группами Евразийской субклады, выделенными по результатам анализа филогенетического дерева (см. текст).

включает только последовательности группы II, выделенной по результатам анализа цит*b*. Группа Южное Предуралье 1 включает последовательности мтДНК от особей с территории западного склона Южного Урала (Игнатьевская пещера и Кинзебулатово); группа Южное Предуралье 2 – последовательности мтДНК от особей из Бузулукского бора, участка оренбургского заповедника Айтуарская степь и из окрестностей горы Верблюжка (юг и юго-запад Уральского региона). На рис. 4 представлены данные по распространению различных групп Евразийской субклады в пределах Уральского региона.

По результатам анализа медианной сети (рис. 3), среди гаплотипов, не вошедших ни в одну из групп Евразийской субклады, выделенных в ходе анализа филогенетического дерева (рис. 2), нами отмечено множество тяготеющих друг к другу гаплотипов, формирующих звездчатую структуру, и несколько сильно дифференцированных одиночных или парных гаплотипов из локалитетов Среднего и Южного Урала, Вятко-Камского Предуралья, Бузулукского бора, Алтайского края и республики Алтай (северный Алтай и северные предгорья Алтая). Тяготеющие друг к другу гаплотипы из звездчатой структуры (рис. 3, пунктирная линия) занимают связующее положение между всеми остальными группами Евразийской субклады. В дальнейшем, в описании результатов и их обсуждения, для обозначения данного множества близких гаплотипов будет использоваться наименование “Урало-Сибирское множество гаплотипов” и оно будет рассматриваться наравне с другими группами гаплотипов, выделенными в пределах

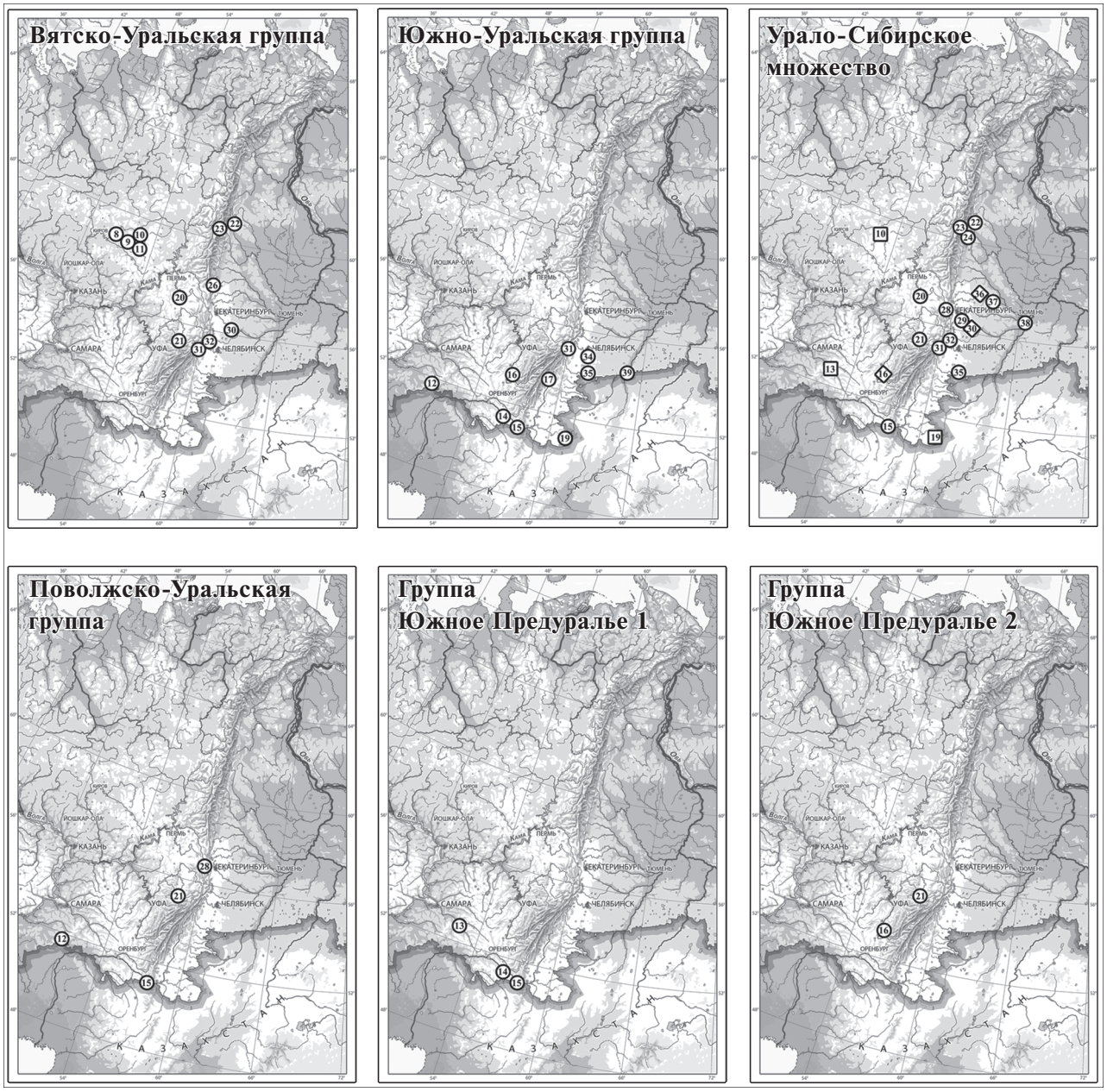

Рис. 4. Распределение групп Евразийской субклады по локалитетам в пределах Уральского региона. Номера локалитетов соответствуют таковым в Приложение, табл. 1, 2 и на рис. 1. На карте "Урало-Сибирское множество" кругами отмечены локалитеты, где встречены гаплотипы Урало-Сибирского множества и нет гаплотипов, не попавших ни в одну из групп; квадратами – локалитеты, где не встречены гаплотипы Урало-Сибирского множества и встречены гаплотипы, не включенные ни в одну из групп; ромбами – локалитеты, где встречены гаплотипы Урало-Сибирского множества и гаплотипы, не попавшие ни в одну из групп.

Евразийской субклады по результатам анализа филогенетического дерева и медианной сети. Оставшиеся, сильно дифференцированные разрозненные гаплотипы, не включенные ни в одну из групп на рис. 3, удалены друг от друга и от гаплотипов других групп Евразийской субклады на дистанции, сопоставимые с межгрупповыми для Евразийской субклады.

Генетическое разнообразие и демографическая история Сино-Русской клады

Оценка индексов генетического разнообразия была проведена для Средневосточной и Сино-Русской клад *M. arvalis* s. str. формы obscurus, а также субклад Сино-Русской клады по каждому из маркеров мтДНК отдельно (таблица). По последовательностям цит*b* + КР оценку проводили

для Сино-Русской клады в целом и для всех внутренних группировок, выделенных в данной кладе ранее в ходе анализа (таблица). Анализ изменчивости каждого из маркеров мтДНК в пределах Сино-Русской клады показывает: 1) используемый фрагмент КР мтДНК существенно более изменчив, чем полная последовательность цит*b* (нуклеотидное разнообразие в 2 раза выше при анализе последовательностей, отнесенных к Сино-Русской кладе); 2) для Евразийской субклады характерно большее разнообразие по каждому из рассматриваемых маркеров, но при этом по цит*b* нуклеотидное разнообразие в Евразийской субкладе в 3 раза выше, чем в Крымской, а по КР мтДНК только в 1.5 раза.

Результаты тестов на селективную нейтральность, а также анализа частот парных различий по последовательностям цит*b*, КР мтДНК и цит*b* + КР как в Сино-Русской кладе в целом, так и в каждой из субклад (таблица; Приложение, рис. 3) показывают, что данные группы в недавнем прошлом прошли через стадию увеличения эффективного размера популяции, что могло быть связано с экспансией популяций *M. arvalis* s. str. и расселением по современному ареалу.

Анализ индексов генетического разнообразия и тесты на селективную нейтральность для отдельных групп Евразийской субклады по последовательностям цит*b* + КР (таблица) показали, что только в случае Южно-Уральской группы и Урало-Сибирского множества гаплотипов достоверно можно говорить об увеличении эффективного размера популяций в недавнем прошлом.

Сравнение внутри- и межгрупповых дистанций (*T3P*) по последовательностям цит*b* + КР (Приложение, табл. 4) показывает, что наиболее дифференцированной является Крымская группа гаплотипов (Крымская субклада), что подтверждает результаты филогенетических реконструкций. Средняя межгрупповая дистанция (*T3P*) между Сино-Русской и Средневосточной кладами *M. arvalis* s. str. по последовательностям цит*b* составила 0.0304 ± 0.0046.

ОБСУЖДЕНИЕ

Изменчивость использованных маркеров мтДНК

Проведенный анализ изменчивости обоих маркеров мтДНК для Сино-Русской клады *M. arvalis* s. str. формы obscurus показал, что в целом в пределах использованного участка КР мтДНК число вариабельных сайтов меньше (71 сайт, или 8.875% от общего числа сайтов), чем в пределах полной последовательности цит*b* (127 сайтов, или 11.11%). Однако число парсимонично информативных сайтов в последовательности КР мтДНК больше как по общему числу, так и в процентном соотношении к числу вариабельных сайтов (63 сайта, или 88.73% от числа вариабельных), чем в пределах полной последовательности цит*b* (52 сайта, или 40.94% от числа вариабельных). Также нуклеотидное разнообразие (таблица) среди последовательностей КР мтДНК оказывается выше, чем среди последовательностей цит*b*, приблизительно в 2 раза: $8.43 \times 10^{-3} \pm 4.4 \times 10^{-3}$ и $4.46 \times 10^{-3} \pm 2.4 \times 10^{-3}$ соответственно. Подобное соотношение изменчивых и парсимонично информативных сайтов при сравнении цит*b* и КР мтДНК наблюдается и у других видов млекопитающих, в частности у сибирской косули [46], и, по-видимому, является следствием особенностей этих двух фрагментов (кодирующий цит*b* и не кодирующий КР мтДНК).

Несмотря на то, что результаты теста на однородность данных (конгруэнтность двух рассматриваемых митохондриальных маркеров) были незначимы, что позволило использовать оба маркера в рамках одной филогенетической реконструкции, имеются некоторые различия между филогенетическими реконструкциями, полученными по каждому из маркеров отдельно. Таким образом, при проведении филогенетической реконструкции с использованием обоих маркеров мтДНК в пределах Сино-Русской клады каждый из них позволяет выявить уникальные различия между последовательностями мтДНК. Эта ситуация отличается от предыдущей попытки совместного использования в филогенетических реконструкциях обыкновенной полевки цит*b* и КР мтДНК, проведенных на примере *M. arvalis* s. str. формы arvalis [10]. В этой работе в анализ, наряду с полными последовательностями цит*b* (1143 пн), были включены данные о частичных последовательностях КР мтДНК (304 пн), включающих один из двух вариабельных участков (располагающийся в 5'-конце КР мтДНК). В этом случае было показано, что включение в анализ частичных последовательностей КР мтДНК лишь повторяет результаты, полученные при анализе последовательностей цит*b*.

Исходя из этого, можно говорить о том, что использование только одного из двух рассматриваемых маркеров для описания филогении, внутренних процессов дифференциации и выделения групп равного ранга в пределах Сино-Русской клады *M. arvalis* s. str. формы obscurus недостаточно и желательно их совместное применение для проведения анализа в пределах данной митохондриальной линии.

Филогенетические реконструкции, внутренняя структура и демографическая история Сино-Русской клады

Наши данные подтвердили существование в пределах *M. arvalis* s. str. формы obscurus двух ра-

Таблица. Индексы генетического разнообразия, результаты тестов на селективную нейтральность и суммы квадратических отклонений частот парных различий для клад, субклад и групп *M. arvalis* s. str. формы obscurus

Маркер	Выборка	*N*	*Nh*	*h* ± СКО	π ± СКО	*k*	*D*	*Fs*	SSD_1	SSD_2
цит*b* 1143 пн	*M. arvalis* s. str. форма obscurus	196	112	0.985 ± 0.004	$9.1 \times 10^{-3} \pm 4.6 \times 10^{-3}$	10.4	–1.97**	–24.16***	0.103***	0.005
	Средне-Восточная клада	19	11	0.942 ± 0.03	$8.21 \times 10^{-3} \pm 4.41 \times 10^{-3}$	9.4	0.03	0.19	0.028	0.027
	Сино-Русская клада	177	101	0.983 ± 0.004	$4.46 \times 10^{-3} \pm 2.4 \times 10^{-3}$	5.1	–2.43***	–25.23***	0.071***	0.003
	Евразийская субклада	161	93	0.98 ± 0.005	$3.97 \times 10^{-3} \pm 2.17 \times 10^{-3}$	4.5	–2.5***	–25.49***	0.044***	0.003
	Крымская субклада	16	8	0.867 ± 0.06	$1.4 \times 10^{-3} \pm 0.98 \times 10^{-3}$	1.6	–1.51*	–3.71**	0.011	0.011
КР мтДНК 800 пн	Сино-Русская клада	138	77	0.981 ± 0.004	$8.43 \times 10^{-3} \pm 4.4 \times 10^{-3}$	6.7	–1.54*	–24.86***	0.004	0.005
	Евразийская субклада	131	71	0.979 ± 0.005	$7.29 \times 10^{-3} \pm 3.9 \times 10^{-3}$	5.8	–1.72*	–25.12***	0.004	0.005
	Крымская субклада	7	6	0.952 ± 0.096	$5 \times 10^{-3} \pm 3.3 \times 10^{-3}$	4	–0.22	–1.59	0.021	0.021
цит*b* + КР 1943 пн	Сино-Русская клада	137	98	0.994 ± 0.002	$5.82 \times 10^{-3} \pm 2.9 \times 10^{-3}$	11.3	–2.07*	–24.23***	0.001	0.001
	Евразийская субклада	130	91	0.993 ± 0.002	$5.12 \times 10^{-3} \pm 2.6 \times 10^{-3}$	9.9	–2.16**	–24.38***	0.0004	0.001
	Крымская субклада	7	7	1 ± 0.076	$3.19 \times 10^{-3} \pm 2 \times 10^{-3}$	6.2	–0.69	–2.5*	0.024	0.024
	Вятско-Уральская группа	32	17	0.952 ± 0.017	$2.84 \times 10^{-3} \pm 1.56 \times 10^{-3}$	5.52	–1.51*	–4.31	0.003	0.002
	Южно-Уральская группа	30	20	0.97 ± 0.016	$2.66 \times 10^{-3} \pm 1.47 \times 10^{-3}$	5.16	–1.82*	–9.36**	0.004	0.004
	Поволжско-Уральская группа	10	8	0.933 ± 0.077	$4.47 \times 10^{-3} \pm 2.55 \times 10^{-3}$	8.69	–0.08	–0.62	0.029	0.031
	Группа Южное Предуралье 1	3	3	1 ± 0.272	$2.75 \times 10^{-3} \pm 2.26 \times 10^{-3}$	5.33	–	–	–	–
	Группа Южное Предуралье 2	4	4	1 ± 0.177	$3.69 \times 10^{-3} \pm 2.62 \times 10^{-3}$	7.17	–	–	–	–
	Урало-Сибирское множество	39	30	0.983 ± 0.011	$2.41 \times 10^{-3} \pm 1.34 \times 10^{-3}$	4.67	–2.17***	–25.09***	0.005	0.005

* $p \le 0.05$; ** $p \le 0.01$; *** $p \le 0.001$.

Примечание. *N* – число последовательностей в группе; *Nh* – число гаплотипов; *h* – гаплотипическое разнообразие; π – нуклеотидное разнообразие; *k* – среднее число парных различий; *D* – результат теста Таджимы на селективную нейтральность; *Fs* – результат теста Фу на селективную нейтральность; SSD_1 – сумма квадратичных отклонений для модели демографической экспансии; SSD_2 – сумма квадратичных отклонений для модели пространственной экспансии.

нее выделенных [8, 17] митохондриальных клад (Средневосточной и Сино-Русской) и представления о том, что область распространения Сино-Русской клады занимает наибольшую часть ареала *M. arvalis* s. str. по сравнению со всеми остальными кладами, включая клады формы arvalis.

Включение в анализ последовательностей КР мтДНК и совместный анализ по двум маркерам мтДНК позволили провести описание внутренней структуры Сино-Русской клады, определяющейся наличием групп родственных гаплотипов, удаленных друг от друга на различные дистанции. Наиболее дифференцированной в пределах Сино-Русской клады является группа последовательностей мтДНК особей с территории п-ова Крым, выделенная нами, на основании анализа двух маркеров мтДНК, в Крымскую субкладу. Все остальные последовательности мтДНК Сино-Русской клады объединены в Евразийскую субкладу.

Сравнение генетических дистанций между субкладами и группами Сино-Русской клады (Приложение, табл. 4) с данными о межгрупповых дистанциях между митохондриальными кладами *M. arvalis* s. str. ([8]; результаты нашей работы) показывает, что дистанции между субкладами и группами Сино-Русской клады от двух до 10 раз ниже, чем между кладами *M. arvalis* s. str. В частности, дистанция между Средневосточной и Сино-Русской кладами (0.0304 ± 0.0046) более чем в 2 раза превышает дистанцию между Евразийской и Крымской субкладами Сино-Русской клады (0.012 ± 0.002) (Приложение, табл. 4).

Сопоставление генетических дистанций между кладами *M. arvalis* s. str. и субкладами и группами Сино-Русской клады показывает, что процессы дифференциации современных групп, отнесенных к Сино-Русской кладе, происходили, по-видимому, значительно позже, чем формирование филогенетической структуры *M. arvalis* s. str. в западной части ареала. При этом для полного описания процессов формирования ареала и истории *M. arvalis* s. str. в восточной части ареала необходимо привлечение в анализ данных о последовательностях мтДНК ископаемых образцов *M. arvalis* s. str. с территории современного распространения Сино-Русской клады.

Границы распространения каждой из двух выделенных субклад Сино-Русской клады на данный момент не могут быть точно описаны. По имеющимся данным (анализ последовательностей цит*b* + КР) можно утверждать, что Евразийская субклада распространена в центральной части Северной Еразии от Самарской и Кировской областей на западе до северного Алтая на востоке. Однако филогенетическая реконструкция с использованием КР мтДНК показала, что последовательность от особи с Таманского п-ова [22] по данному маркеру относится к группе последовательностей, которые при анализе двух маркеров мтДНК формируют Евразийскую субкладу, что позволяет предположить, что зона распространения Евразийской субклады на западе может доходить вплоть до Черноморского побережья, Северного Кавказа и зоны симпатрии двух форм *M. arvalis* s. str. (arvalis и obscurus). Крымская субклада, по-видимому, является единственной группой *M. arvalis* s. str., распространенной на территории п-ова Крым, хотя вопрос о том, распространена ли данная группа за пределами полуострова (на юго-востоке Украины и/или на территории Таманского п-ова), не может быть решен без привлечения новых данных об изменчивости мтДНК *M. arvalis* s. str. на этих территориях. Мы предполагаем, что относительно высокий уровень дифференциации крымских *M. arvalis* s. str. по молекулярным маркерам может быть связан не столько с более ранней дивергенцией Крымской субклады, сколько с ее изоляцией. Включение в анализ данных с юга Восточно-Европейской равнины позволит проверить данные предположения.

Введение в анализ новых данных необходимо еще и потому, что неравномерное покрытие ареала и использование данных из значительно удаленных друг от друга частей ареала может приводить к неверным интерпретациям и появлению артефактов анализа [47, 48], в том числе к выявлению несуществующих гаплогрупп за счет отсутствия в анализе существующих в настоящее время промежуточных гаплотипов [49].

Среди территорий, населенных Сино-Русской кладой, на данный момент наиболее исследованной является Уральский регион, тогда как другие регионы изучены в значительно меньшей степени. Первым регионом, перспективным для дальнейшего изучения, как говорилось выше, является южная часть Восточно-Европейской равнины и Северный Кавказ. Важность изучения этого региона заключается в необходимости как оценки границ распространения Сино-Русской клады, так и проверки гипотезы об изолированности Крымской субклады.

Второй перспективный регион – территория Северо-Западного Китая и прилежащие территории Алтая и Северо-Восточного Казахстана. Именно в этом регионе распространены описанная по последовательностям цит*b* группа III и сильно дифференцированные (по последовательностям цит*b* + КР) “алтайские” гаплотипы. (Приложение, рис. 1). Отсутствие данных о последовательностях КР мтДНК для особей, отнесенных к группе III, оставляет открытым вопрос о степени ее отличия от других групп, так как наблюдаемые различия только по одному маркеру мтДНК, как мы показали, не могут являться однозначным критерием для выделения групп равного ранга в пределах Сино-Русской клады и, как

следствие, недостаточны для описания внутренних процессов дифференциации.

Так же необходимо дополнительное изучение границ распространения *M. arvalis* s. str. формы obscurus, так как авторами [25, 26, 28] приводятся существенно различающиеся данные. В частности, в качестве возможных районов распространения *M. arvalis* s. str. формы obscurus могут рассматриваться центральная часть Турции [28] и изолят *M. arvalis* s. l., расположенный к юго-западу от оз. Байкал [25, 50]. Для обоих регионов подтверждено (с использованием цитогенетических и молекулярно-генетических маркеров) наличие поселений *M. rossiaemeridionalis* [24, 51], что, однако, не может являться доказательством отсутствия в них *M. arvalis* s. str. из-за малочисленности опубликованных данных.

Вопрос о регионе происхождения Сино-Русской клады также остается открытым. Ни Крымские, ни Алтайские последовательности на филогенетических деревьях и по цит*b*, и по цит*b* + КР не занимают базального положения по отношению к другим последовательностям Сино-Русской клады. При анализе цит*b* + КР базальное положение на дереве занимают последовательности Южно-Уральской группы гаплотипов, однако это не является достаточным основанием для того, чтобы считать юг Урала регионом происхождения Сино-Русской клады.

Анализ демографической истории как Сино-Русской клады в целом, так и отдельно Крымской и Евразийской субклад показал, что по каждому из маркеров мтДНК демографическая история данных линий может быть описана событием увеличения эффективного размера популяции, которое, вероятно, является результатом недавнего расселения Сино-Русской клады по территории ее современной области распространения. Последующий анализ демографической истории, проведенный для отдельных групп Евразийской субклады, показал (таблица), что только для Южно-Уральской группы и Урало-Сибирского множества гаплотипов можно однозначно говорить о свидетельствах увеличения эффективного размера популяции. Вероятно, вклад отдельных групп Евразийской субклады в демографическую и пространственную экспансию был неодинаков. Это косвенно подтверждается характером распространения рассматриваемых групп в Уральском регионе (рис. 4). Из групп, выделенных по результатам филогенетической реконструкции, наиболее широко распространены Южно-Уральская и Вятско-Уральская группы, а также Урало-Сибирское множество гаплотипов. Зоны распространения Южно-Уральской и Вятско-Уральской групп незначительно перекрываются только в районе границы Среднего и Южного Урала (рис. 4), при этом Южно-Уральская группа встречается исключительно в локалитетах Южного Урала, а Вятско-Уральская незначительно заходит на Южный Урал и в основном распространена на территории Среднего и Северного Урала и Северного Предуралья. Урало-Сибирское множество широко распространено от Южного Урала (пос. Айтуар) до северной границы *M. arvalis* s. str. на Урале (г. Ивдель). Три другие группы (Поволжско-Уральская, Южное Предуралье 1 и Южное Предуралье 2) распространены не так широко, встречаются в локалитетах Южного Урала, и только Поволжско-Уральская группа на севере своей зоны распространения заходит на Средний Урал (рис. 4).

Основываясь на характере пространственного распределения гаплотипов групп Евразийской субклады нами выдвинута следующая гипотеза.

Филогеографическая структура Евразийской субклады отражает как минимум два последовательных этапа формирования современного сплошного ареала *M. arvalis* s. str. формы obscurus: этап дифференциации групп и этап последующей их экспансии с формированием зон контакта. При этом более высокое генетическое разнообразие *M. arvalis* s. str. формы obscurus в популяциях Южного Урала, обусловленное тем, что из всех рассматриваемых групп область распространения только одной (Вятско-Уральской) располагается преимущественно за пределами Южного Урала, является косвенным свидетельством более длительной истории существования генетически преемственных популяций *M. arvalis* s. str. в южной части Уральского региона.

Выводы

1. Анализ изменчивости двух маркеров мтДНК (цит*b* и КР мтДНК) показал, что для описания внутренней структуры, истории расселения и процессов дифференциации в пределах Сино-Русской клады *M. arvalis* s. str. необходимо включение в анализ обоих маркеров, так как каждый из них вносит существенный вклад в филогенетические реконструкции. Таким образом, при проведении новых филогенетических реконструкций в пределах Сино-Русской клады целесообразно совместное использование гена цит*b* и КР мтДНК.

2. Сопоставление генетических дистанций между кладами *M. arvalis* s. str., субкладами и группами Сино-Русской клады показывает, что заселение современной области распространения Сино-Русской клады и процессы дифференциации современных групп, отнесенных к ней, происходили, по-видимому, позже, чем в западной части ареала *M. arvalis* s. str. (зона распространения формы arvalis). Для подтверждения этой гипотезы необходимо привлечение в анализ данных

о последовательностях мтДНК ископаемых образцов *M. arvalis* s. str. с территории современного распространения Сино-Русской клады.

3. По результатам филогенетической реконструкции с использованием двух маркеров мтДНК (ген цит*b* и КР мтДНК) в пределах Сино-Русской клады описаны Крымская и Евразийская субклады. Анализ демографической истории Сино-Русской клады в целом, а также двух субклад показал, что в недавнем прошлом они прошли через стадию увеличения эффективного размера популяции.

4. Выдвинута гипотеза о том, что экспансия Евразийской субклады состояла как минимум из двух последовательных этапов, на первом из которых произошла дифференциация предковых последовательностей современных групп Евразийской субклады, после чего последовала экспансия части сформировавшихся групп. Для территорий Северного, Среднего и Южного Урала наибольшее генетическое разнообразие (по молекулярно-генетическим маркерам) характерно для южных широт, что является косвенным свидетельством более длительной истории существования генетически преемственных популяций вида на Южном Урале.

5. Полученные результаты позволяют предполагать, что перспективными регионами для реконструкции филогенетических взаимоотношений в пределах Сино-Русской клады и истории формирования восточной части ареала *M. arvalis* s. str. являются южная часть Восточно-Европейской равнины и Северо-Запад Китая с прилежащими территориями Алтая и Северо-Восточного Казахстана.

Авторы выражают глубокую благодарность Зоологическому музею ИЭРиЖ УрО РАН и коллегам за предоставленный материал коллекций, использованных в данной работе: д.б.н А.В. Бородину (ИЭРиЖ УрО РАН), к.б.н. Т.В. Струковой (ИЭРиЖ УрО РАН), С.Б. Ракитину (ИЭРиЖ УрО РАН), Д.А. Топорковой (ИЭРиЖ УрО РАН). За помощь в организации полевых выездов и отловах мелких млекопитающих: к.б.н. С.В. Зыкову (ИЭРиЖ УрО РАН), к.б.н. М.А. Фоминых (ИЭРиЖ УрО РАН), Л.И. Амерхановой (ИЭРиЖ УрО РАН), к.б.н. Е.В. Зиновьеву (ИЭРиЖ УрО РАН), к.б.н. Е.П. Изварину (ИЭРиЖ УрО РАН), к.б.н. Е.Ю. Захаровой (ИЭРиЖ УрО РАН), к.б.н. Т.С. Ослиной (ИЭРиЖ УрО РАН), к.б.н. А.О. Шкурихину (ИЭРиЖ УрО РАН), к.б.н. Р.Ю. Дудко (ИСиЭЖ СО РАН). Отдельную благодарность авторы выражают Объединенной дирекции государственных природных заповедников “Оренбургский” и “Шайтан-Тау”, лично О.В. Сороке и инспекторам участков “Таловская степь”, “Айтуарская степь” и “Ащисайская степь” за помощь в организации и проведении отловов мелких млекопитающих на участках Оренбургского заповедника, и администрации ФГБУ “Национального парка “Бузулукский бор” за помощь в организации отловов на территории национального парка. Также авторы благодарят д.м.н. Г.А. Цаура и коллектив лаборатории молекулярной биологии, иммунофенотипирования и патоморфологии Центра детской онкологии и гематологии ОДКБ № 1 (г. Екатеринбург) за предоставленную возможность использования генетического анализатора ABI Prism 3130 (Applied Biosystems, USA).

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 16-04-01486-а и комплексной программы УрО РАН, проект № 18-4-4-43.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Малыгин В.М.* Систематика обыкновенных полевок. М.: Наука, 1983. 207 с.
2. *Мейер М.Н., Голенищев Ф.Н., Раджабли С.И., Саблина О.Л.* Серые полевки фауны России и сопредельных территорий // Тр. ЗИН РАН. 1996. Т. 232. 320 с.
3. *Мейер М.Н., Орлов В.М., Схолль Е.Д.* Виды-двойники в группе *Microtus arvalis* (Rodentia, Cricetidae) // Зоологич. журн. 1972. Т. 51. С. 724–738.
4. *Wilson D.E., Reeder D.A.M.* (ed.). Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference. JHU Press, 2005. 2142 p.
5. *Абрамсон Н.И., Лисовский А.А.* Подсемейство Arvicolinae // Млекопитающие России: систематико-географический справочник: Сб. трудов Зоологич. музея МГУ. 2012. Т. 52. С. 127–141.
6. *Лавренченко Л.А., Потапов С.Г., Булатова Н.Ш., Голенищев Ф.Н.* Изучение естественной гибридизации двух форм обыкновенной полевки (*Microtus arvalis*) молекулярно-генетическими и цитогенетическими методами //Докл. Акад. наук. 2009. Т. 426. № 1. С. 135–138.
7. *Малыгин В.М.* Морфологические критерии определения голотипов таксонов видов обыкновенных полевок (Microtus, Rodentia, Mammalia) // Докл. Акад. наук. 1996. Т. 346. № 2. С. 282–286.
8. *Tougard C., Montuire S., Volobouev V. et al.* Exploring phylogeography and species limits in the Altai vole (Rodentia: Cricetidae) // Biol. J. Linnean Soc. 2013. V. 108. № 2. P. 434–452.
9. *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.
10. *Tougard C., Renvoise E., Petitjean A., Quere J.P.* New insight into the colonization processes of common voles: inferences from molecular and fossil evidence // PLoS One. 2008. V. 3. № 10. P. e3532.
11. *Bužan E.V., Förster D.W., Searle J.B., Kryštufek B.* A new cytochrome b phylogroup of the common vole (*Microtus arvalis*) endemic to the Balkans and its implications for the evolutionary history of the species // Biol. J. Linnean Soc. 2010. V. 100. № 4. P. 788–796.
12. *Булатова Н.Ш., Потапов С.Г., Лавренченко Л.А.* Геномная и хромосомная политипия в исследовании

маркеров митохондриальной и ядерной ДНК у обыкновенных полевок (группа *Microtus arvalis*) // Генетика. 2010. Т. 46. № 5. С. 668–676.

13. *Громов А.Р., Булатова Н.Ш., Потапов С.Г. и др.* Изучение зоны гибридизации 46-хромосомных форм полевки обыкновенной на территории Владимирской области // Структура вида у млекопитающих: Матер. конф. М.: Т-во научн. изд. КМК, 2010. С. 29.
14. *Fink S., Excoffier L., Heckel G.* Mitochondrial gene diversity in the common vole *Microtus arvalis* shaped by historical divergence and local adaptations // Mol. Ecol. 2004. V. 13. № 11. P. 3501–3514.
15. *Stojak J., McDevitt A.D., Herman J.S. et al.* Post-glacial colonization of eastern Europe from the Carpathian refugium: evidence from mitochondrial DNA of the common vole Microtus arvalis // Biol. J. Linnean Soc. 2015. V. 115. № 4. P. 927–939.
16. *Stojak J., McDevitt A.D., Herman J.S. et al.* Between the Balkans and the Baltic: Phylogeography of a common vole mitochondrial DNA lineage limited to Central Europe // PLoS One 2016. V. 11. № 12. P. e0168621.
17. *Mahmoudi A., Darvish J., Aliabadian M. et al.* New insight into the cradle of the grey voles (subgenus Microtus) inferred from mitochondrial cytochrome b sequences // Mammalia. 2017. V. 81. № 6. P. 583–593.
18. *Irwin D.M., Kocher T.D., Wilson A.C.* Evolution of the cytochrome b gene of mammals // J. Mol. Evol. 1991. V. 32. № 2. P. 128–144.
19. *Clayton D.A.* Transcription and replication of animal mitochondrial DNAs // International Rev. Cytol. 1992. V. 141. P. 217–232.
20. *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.
21. *Zhumabekova B.K., Issakaev Y.M., Surov A.V. et al.* INSDC (GenBank) Режим доступа: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/?term=Microtus+obscurus+Zhumabekova. Дата обновления 11.11.2013.
22. *Tkachenko E.A., Witkowski P.T., Radosa L. et al.* Adler hantavirus, a new genetic variant of Tula virus identified in Major's pine voles (*Microtus majori*) sampled in southern European Russia // Infection, Genetics and Evol. 2015. V. 29. P. 156–163.
23. *Triant D.A., DeWoody J.A.* Accelerated molecular evolution in Microtus (Rodentia) as assessed via complete mitochondrial genome sequences // Genetica. 2006. V. 128. № 1. P. 95–108.
24. *Jaarola M., Martinkova N., Gündüz İ. et al.* Molecular phylogeny of the speciose vole genus *Microtus* (Arvicolinae, Rodentia) inferred from mitochondrial DNA sequences // Mol. Phylogenet. Evol. 2004. V. 33. № 3. P. 647–663.
25. *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.
26. *Загороднюк И.В.* Таксономия и распространение серых полевок (Rodentiformes: Arvicolini) фауны Украины // Млекопитающие Украины. Киев: Наук. думка, 1993. С. 63–76.
27. *Маркова Е.А., Ялковская Л.Э., Зыков С.В.* Таксономическая принадлежность полевок группы "arvalis"(род *Microtus*, Arvicolinae, Rodentia) на северной границе распространения на Урале // Докл. Акад. наук. 2010. Т. 432. № 4. С. 559–562.
28. *Demirsoy A.* Rodents of Türkiye: Türkiye Kemiricileri. Ankara: Meteksan, 2006. 154 p.
29. *Aljanabi S.M., Martinez I.* Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques // Nucl. Acids Res. 1997. V. 25. № 22. P. 4692–4693.
30. *Сибиряков П.А., Амерханова Л.И.* Оценка качества сохраности ДНК в музейных образцах тканей животных // Матер. конф. молодых ученых "Экология: факты, гипотезы, модели," 11–15 апреля 2016 г. Екатеринбург: тошицкий, 2016. С. 108–109.
31. *Tougard C., Delefosse T., Hänni C., Montgelard C.* Phylogenetic relationships of the five extant rhinoceros species (Rhinocerotidae, Perissodactyla) based on mitochondrial cytochrome b and 12S rRNA genes // Mol. Phylogenet. Evol. 2001. V. 19. № 1. P. 34–44.
32. *Haring E., Herzig Straschil B., Spitzenberger F.* Phylogenetic analysis of Alpine voles of the Microtus multiplex complex using the mitochondrial control region // J. Zool. System. Evol. Res. 2000. V. 38. № 4. P. 231–238.
33. *Hall T.A.* BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT // Nucl. Acids Sympos. Ser. 1999. V. 41. P. 95–98.
34. *Tamura K., Stecher G., Peterson D. et al.* MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. // Mol. Biol. Evol. 2013. V. 30. № 12. P. 2725–2729.
35. *Ronquist F., Huelsenbeck J.P.* MrBayes3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models // Bioinformatics. 2003. V. 19. № 12. P. 1572–1574.
36. *Nylander J.A.A.* MrModeltest, Version 2. Program distributed by the author. Uppsala: Evol. Biol. Centre, Uppsala Univ., 2004.
37. *Bandelt H.-J., Forster P., Röhl A.* Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies // Mol. Biol. Evol. 1999. V. 16. P. 37–48.
38. *Excoffier L., Laval G., Schneider S.* An integrated software package for population genetics data analysis // Evol. Bioinformat. Online. 2005. V. 1. № 4. P. 47–50.
39. *Librado P., Rozas J.* DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data // Bioinformatics. 2009. V. 25. № 11. P. 1451–1452.
40. *Farris J.S., Källersjö M., Kluge A.G., Bult C.* Testing significance of incongruence // Cladistics. 1995. V. 10. № 3. P. 315–319.
41. *Swofford D.L.* PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4.0b10. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Assoc., 2002.
42. *Tamura K.* Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G + C-content biases // Mol. Biol. Evol. 1992. V. 9. P. 678–687.
43. *Tavaré S.* Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences, Some mathematical questions in biology–DNA sequence analysis // Lectures on Mathematics in the Life Sciences. 1986. V. 17. № 2. P. 57–86.

44. *Kimura M.* A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences // J. Mol. Evol. 1980. V. 16. № 2. P. 111–120.

45. *Hasegawa M., Kishino K., Yano T.* Dating the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA // J. Mol. Evol. 1985. V. 22. № 2. P. 160–174.

46. *Звычайная Е.Ю., Данилкин А.А., Холодова М.В. и др.* Анализ изменчивости контрольного региона и гена цитохрома b мтД-НК сибирской косули *Capreolus pygargus* Pall. // Изв. РАН. Сер. биологич. 2011. № 5. С. 511–517.

47. *Абрамсон Н.И.* Филогеография: итоги, проблемы, перспективы // Вавилов. журн. генет. и селек. 2007. Т. 11. № 2. С. 307–331.

48. *Хрунык Ю.Я., Богданов В.Д., Ялковская Л.Э. и др.* Генетическое разнообразие налима (*Lota lota* L., 1758) Западной Сибири по результатам анализа полиморфизма мтДНК // Генетика. 2017. Т. 53. № 2. С. 214–222.

49. *Политыко Ю.К., Сибиряков П.А.* Изменчивость митохондриальной ДНК арктического гольца (*Salvelinus alpinus* L., 1758) с Полярного Урала // Матер. конф. Молодых ученых "Экология. Генетика. Эволюция", 13–17 апреля 2015 г. Екатеринбург: Гощицкий. 2015. С. 122–128.

50. *Yigit N., Hutterer R., Krystufek B., Amori G. Microtus arvalis.* The IUCN Red List of Threatened Species 2016. e.T13488A22351133. [Электронный ресурс]. Режим доступа: http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-2.RLTS.T13488A22351133.en. Дата обновления. 10.06.2016.

51. *Демидович А.П., Липин С.И.* Особенности биологии обыкновенных полевок в Иркутской области // Вестн. Иркутск. гос. с.-х. акад. 1997. № 3. С. 1–25.

Phylogeography of the Common Vole *Microtus arvalis*, the Obscurus Form (Rodentia, Arvicolinae): New Data on Mitochondrial DNA Variability

P. A. Sibiryakov[a], *, N. N. Tovpinets[b], T. A. Dupal[c], V. L. Semerikov[a], L. E. Yalkovskaya[a], and E. A. Markova[a]

[a] *Institute of Plant and Animal Ecology, Ural Branch of Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, 620144 Russia*

[b] *Centre of Hygiene and Epidemiology in the Republic of Crimea and city of Sevastopol, Simferopol, 395034 Russia*

[c] *Institute of Systematics and Ecology of Animals, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630091 Russia*

**e-mail: p_sibiryakov@rambler.ru*

Based on the variability of the two markers, the cytochrome *b* gene (1143 base pairs) and the part of the mitochondrial DNA control region (800 base pairs), the genetic diversity in the common vole *Microtus arvalis* Pall., 1778 of the obscurus chromosomal form is analyzed. A total of 145 specimens collected in 39 localities from the Crimean Peninsula in the west to the northern Altai in the east are studied. Based on the cytochrome *b* gene sequences, all individuals of *M. arvalis* obscurus captured in the regions under study are assigned to the previously described Sino-Russian clade, which is distributed over the major part of the entire range of the obscurus form. An analysis of combined sequences of the two mtDNA markers reveals internal structure of the Sino-Russian clade and suggests the existence of two unequally distributed subclades referred to as the Crimean and the Eurasian one. Within the Eurasian subclade, several geographically localized haplogroups are revealed including the Vyatka-Urals, Volga-Urals, Southern-Urals, Southern Pre-Urals 1 and Southern Pre-Urals 2. The haplogroups are connected with one another through a set of poorly differentiated haplotypes widely spread from the Pre-Urals to Western Siberia. Two haplotypes from the North Altai and northern foothills of Altai are included in the Eurasian subclade being separated from each other and from the haplotypes of other groups to distances comparable with the intergroup distances revealed in this subclade. Results of a demographic analysis allow us to conclude that history of the Sino-Russian clade of *M. arvalis* obscurus exhibits regional specificity. The haplotypes found in 7 localities in the Crimean Peninsula most likely represent one expansion event, whereas for the Eurasian subclade, several successive waves of expansion could be assumed.

Keywords: *Misrotus arvalis*, phyligeography, mitochondrial DNA, Crimea, Urals, Altai.