

УДК 575.858:575.224.232.3:599.323.43

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И МЕЙОТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ДАГЕСТАНСКИХ ПОЛЕВОК *Microtus (Terricola)* *daghestanicus* ВОСТОЧНОЙ ЧАСТИ СЕВЕРНОГО КАВКАЗА

© 2024 г. А. С. Богданов¹, М. М. Ацаева^{2,3}, Д. Д. Арсанукаев⁴, С. Н. Матвеевский^{3, *}

¹Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук, Москва, 119334 Россия

²Комплексный научно-исследовательский институт им. Х.И. Ибрагимова Российской академии наук, Грозный, 344051 Россия

³Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

⁴Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

*e-mail: sergey8585@mail.ru

Поступила в редакцию 27.11.2023 г.

После доработки

Принята к публикации

У дагестанской полевки *Microtus daghestanicus* отмечен высокий уровень кариотипической и молекулярно-генетической изменчивости, однако популяции этого вида в восточной части Северного Кавказа изучены фрагментарно. С целью выявления их генетических особенностей и филогенетических связей с другими конспецифичными популяциями нами исследована выборка дагестанских полевок с юга Чеченской Республики (гора Дайхох). Иммуноцитохимическое исследование синаптомных комплексов в профазе I мейоза продемонстрировало принадлежность указанной популяции к наиболее широко распространенной 54-хромосомной форме *M. daghestanicus*. Анализ полной последовательности митохондриального гена цитохрома *b* показал объединение на филогенетическом древе в один компактный кластер экземпляров из Чечни и изученной ранее дагестанской полевки из Северной Грузии, что указывает на их принадлежность к обособленной генетической форме. В пределах исследованной выборки из Чечни выявлена изменчивость нуклеотидных последовательностей ядерных генов *BRCA1* и *XIST*, что предположительно отражает сложную историю этой популяции, связанную с чередованием событий ее изоляции от соседних популяций и возобновлением контактов между ними.

Ключевые слова: *Microtus daghestanicus*, синаптомный комплекс, молекулярно-генетическая изменчивость, гены *cytb*, *BRCA1*, *XIST*.

DOI: 10.31857/S0016675824040118 EDN: CQKWYB

Виды животных, населяющие высокогорья, представляют собой весьма интересные объекты для изучения генетического полиморфизма и дифференциации. Фрагментарность местообитаний, пригодных для жизни, экстремальные климатические условия и наличие разнообразных труднопреодолимых ландшафтных преград (горных рек, ледников, оползней и пр.), способствующих периодической изоляции популяций, способны значительно ускорить процесс накопления мутаций из-за сокращения эффективной численности особей, а также привести к неравномерной скорости эволюции разных генетических структур — хромосомных наборов, ядерных и митохондриальных геномов. Наиболее зависимы от сложных ландшафтно-климатических условий высокогорных виды, имеющие в силу своей биологии ограниченную способность к быстрым миграциям, например, обитающие под землей постоянно или значительную часть времени [1, 2].

Дагестанская полевка *Microtus daghestanicus* Shidlovsky, 1919 — один из представителей подрода кустарниковых полевок *Terricola* Fatio, 1867, ведущих полуподземный образ жизни. Этот вид обитает на Северном Кавказе и в Закавказье, населяет луга субальпийского пояса гор и характеризуется значительной кариотипической и молекулярно-генетической изменчивостью. У *M. daghestanicus* выявлено 11 кариоморф ($2n = 54, 53, 52, 46, 45, 44, 43, 42^{\text{“A”}}, 42^{\text{“B”}}, 40, 38; NF = 58$), которые возникли в результате робертсоновских транслокаций хромосом [3, 4]. Зона хромосомной изменчивости охватывает, однако, лишь южную часть ареала вида (юг Закавказья), кроме одной формы с $2n = 52$, обнаруженной на западе Дагестана [4, 5]. Хромосомные формы $2n = 38$ и $42^{\text{“A”}}$ с Карабахского и Зангезурского хребтов Закавказья, соответственно, предлагалось рассматривать в качестве самостоятельного вида *M. nasarovi* Shidlovsky, 1938 [5, 6].

Ранее молекулярно-генетический анализ митохондриального гена цитохрома *b* (*cytb*) показал дифференциацию *M. daghestanicus* по крайней мере на четыре внутривидовые группы, несмотря на их сходство по кариотипу ($2n = 54$): одна из них выявлена в западной части Северного Кавказа (в Кабардино-Балкарии и Карачаево-Черкесии), другая — в центральной части Северного Кавказа (в Северной Осетии), третья была представлена единственным экземпляром из Северной Грузии, а четвертая — популяциями Малой Азии [7]. Исследование фрагментов трех ядерных генов — *BRCA1* (breast and ovarian cancer susceptibility protein 1, экзон 11), *IRBP* (interphotoreceptor retinoid-binding protein, экзон 1) и *XIST* (X-inactive specific transcript) — подтвердило генетическое своеобразие лишь дагестанских полевков из Северной Осетии. Все прочие популяции *M. daghestanicus* показали изменчивость, не имеющую отчетливой связи с их географическим происхождением. Однако неожиданное выявление заметной внутривидовой изменчивости генов *BRCA1* и *XIST* у экземпляров из Кабардино-Балкарии и Северной Осетии (наряду с обилием особей, гетерозиготных по ряду нуклеотидных сайтов), может указывать на активный обмен особями и генами между соседними популяциями в указанных регионах Кавказа [7, 8].

Тем не менее, для значительной части ареала *M. daghestanicus* (особенно территории Северного Закавказья и восточной части Северного Кавказа) имеются лишь отрывочные данные по единичным экземплярам и отдельным маркерам [4, 7, 9], что существенно усложняет оценку характера изменчивости вида и доказательство дискретности выявленных молекулярно-генетическими методами внутривидовых форм дагестанской полевки. Для решения этой проблемы необходимо изучение дополнительного материала. Весьма скудные сведения имеются и в отношении особенностей мейоза у особей *M. daghestanicus*: опубликовано лишь электронно-микроскопическое описание профазы I у гибридов 38-хромосомной и 48-хромосомной форм, без изучения родительских особей [4, 10].

Цель настоящей работы — молекулярно-генетический анализ полиморфизма и филогенетических связей одной из популяций *M. daghestanicus* из восточной части Северного Кавказа, а также иммуноцитохимическое исследование сперматозоидов данных животных.

Материалом для данной работы послужили 4 экземпляра *M. daghestanicus*, №№ T23-01 (♂),

T23-19 (♀), T23-20 (♂), T23-21 (♀), отловленные в 2023 г. на горе Дайхох, в Шатойском р-не Чеченской Республики. Впервые для “чистых” кариоморф данного вида, из семенников обоих самцов были получены препараты хромосом на стадии пахитены профазы I мейоза и проведены исследования синаптонемных комплексов (СК) — мультибелковых комплексов, соединяющих гомологичные хромосомы на данном этапе мейотического деления [11]. Получение СК в распластанных ядрах сперматозоидов выполнялось по стандартной методике [12] с некоторыми модификациями [13]. Процедура иммуноцитохимического окрашивания была идентична ранее описанной [14]. Тотальная ДНК была получена от всех особей из фиксированных в этаноле измельченных образцов печени или сердца после их обработки протеиназой К, фенол-хлороформной депротеинизации и последующего осаждения изопропанолом [15]. Праймеры, применявшиеся для амплификации и секвенирования полного гена *cytb* (1143 пн), двух перекрывающихся фрагментов экзона 11 гена *BRCA1* с итоговой протяженностью 1698 пн и двух неперекрывающихся участков гена *XIST* (413 и 585 пн), которые впоследствии были объединены и проанализированы как единая последовательность (998 пн), а также условия проведения ПЦР и статистической обработки полученных данных, идентичны опубликованным ранее [7]. Кроме того, в анализ были включены все доступные в базе GenBank последовательности перечисленных генов дагестанских полевков, а также двух подземных полевков *M. subterraneus* и двух кустарниковых полевков *M. majori* в качестве аутгруппы [7, 9]. Построение дендрограмм по методу Maximum Likelihood (ML) выполнено с помощью компьютерной программы IQTree, версия 2.0-rc2 [16], а обработка их изображений — с помощью программы FigTree 1.4.3 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>). Данное исследование проводится в рамках Государственных заданий № 0088-2024-0011 (ИБР РАН) и № 0092-2022-0002 (ИОГен РАН). При выполнении экспериментальной работы нами использовалось оборудование “Сектора анализа генома” в составе ЦКП “Группа геномных технологий” (ИБР РАН) и ЦКП ОБН РАН “Генетический полиморфизм”.

Иммуноцитохимический анализ выявил 26 СК аутосом и асинаптические половые хромосомы, X и Y (рис. 1). Благодаря идентификации центромер было установлено, что 25 СК и Y являются акроцентриками, X-хромосома — крупный субметацентрик, а аутосомы самой маленькой пары (№ 26) — метацентрики

(рис. 1, б, г). Данный набор хромосом определяет количество хромосомных плеч $NF = 58$. Примечательно, что некоторые участки хроматина между СК окрашивались “центромерными” антителами (рис. 1, г).

Анализ изменчивости гена *syth* (рис. 2, а) показал, что особи *M. daghestanicus* из Чечни объединяются на филогенетическом древе в одну отчет-

ливую, компактную кладу вместе с дагестанской полевкой из Северной Грузии. Несмотря на умеренную генетическую p -дистанцию (0.022) между этой кладой и “сестринской”, объединяющей экземпляры *M. daghestanicus* из Северной Осетии, обе имеют высокую бутстреп-поддержку (99–100%). По ядерным генам получены противоречивые данные: по гену *XIST* три из четырех дагестанских полевков с горы Дайхох объедини-

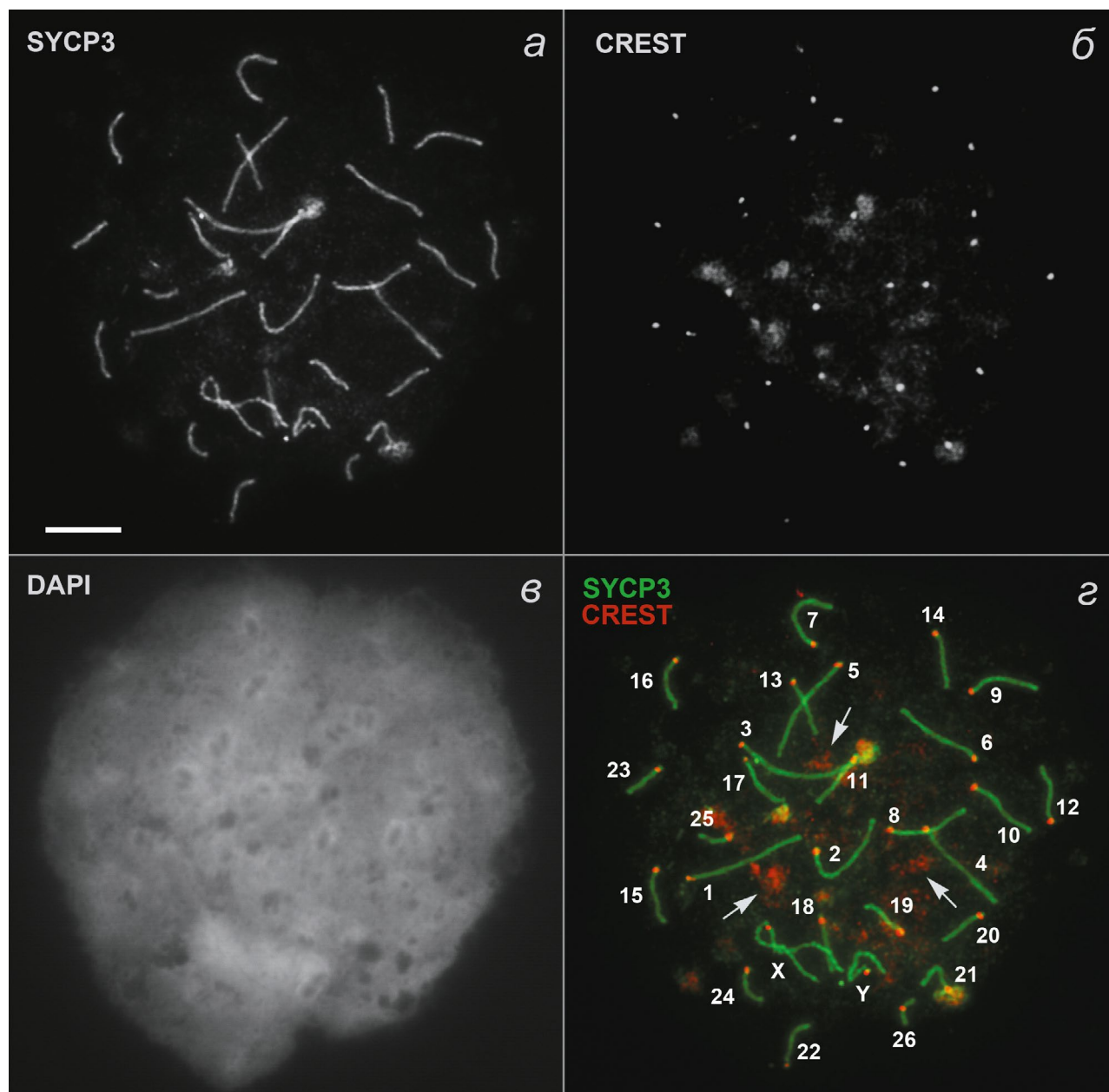


Рис. 1. Распластанное ядро сперматоцита дагестанской полевки *M. daghestanicus* (№ T23-01), стадия пахитены. Проведена иммунодетекция белка латеральных элементов СК — SYCP3 (а), белка кинетохор (центромеры) с помощью антител CREST (б). Хроматин окрашен DAPI (в). Совмещенное изображение белков SYCP3 и центромеры представлено отдельно (г). Некоторые участки хроматина между СК являются CREST-позитивными (отмечены стрелками). Масштаб — 5 мкм.

лись с североосетинскими (рис. 2,б). По гену *BRCA1* все изученные особи из Чечни оказались сходными с большинством конспецифичных экземпляров из западной части Северного Кавказа (рис. 2,в). Интересно, что как по гену *XIST*, так и по гену *BRCA1* проявляется заметная изменчивость выборки из Чечни, несмотря на малочисленность составляющих ее животных.

Итак, благодаря анализу СК, который позволяет определить количество хромосом и уточнить их морфологию [17], нами для кариотипов дагестанских полевок из Чечни были впервые установлены диплоидное число ($2n = 54$) и количество хромосомных плеч ($NF = 58$), что соответствует большинству популяций этого вида на Северном Кавказе. Дагестанская полевка относится к тем многочисленным видам полевоцых, у которых выявлены асиноптические половые хромосомы [18], такие же, как и обнаруженные ранее у особей *M. daghestanicus* с “гибридным” кариотипом [4, 10]. Таким образом, асинопсис половых хромосом — это видовая характеристика, а не проявление гибридной стерильности. Необычное соединение “центромерных” антител с участ-

ками хроматина между СК, вероятно, связано с некоторыми его формами или конформациями, поскольку известно, что белок CENP-A является центромерным вариантом гистона H3 [19].

Несмотря на отсутствие кариотипической изменчивости во всех популяциях, которые были исследованы молекулярно-генетическими методами, дагестанские полевки, отловленные в Чечне на горе Дайхох, продемонстрировали отчетливое своеобразие по митохондриальной ДНК. Так как они образуют единый кластер вместе с экземпляром из Северной Грузии — из локалитета, географически достаточно удаленного от Чеченской Республики, можно с большой вероятностью предполагать, что в данном случае мы имеем дело не с индивидуальной изменчивостью или особенностью отдельной популяции, а с обособленной генетической формой, имеющей сравнительно широкое распространение. Генетическая структура вида по ядерным генам прослеживается менее отчетливо, по-видимому, из-за меньшей скорости их эволюции в сравнении с митохондриальным геномом. Однако полиморфизм генов *XIST* и *BRCA1* в изученной

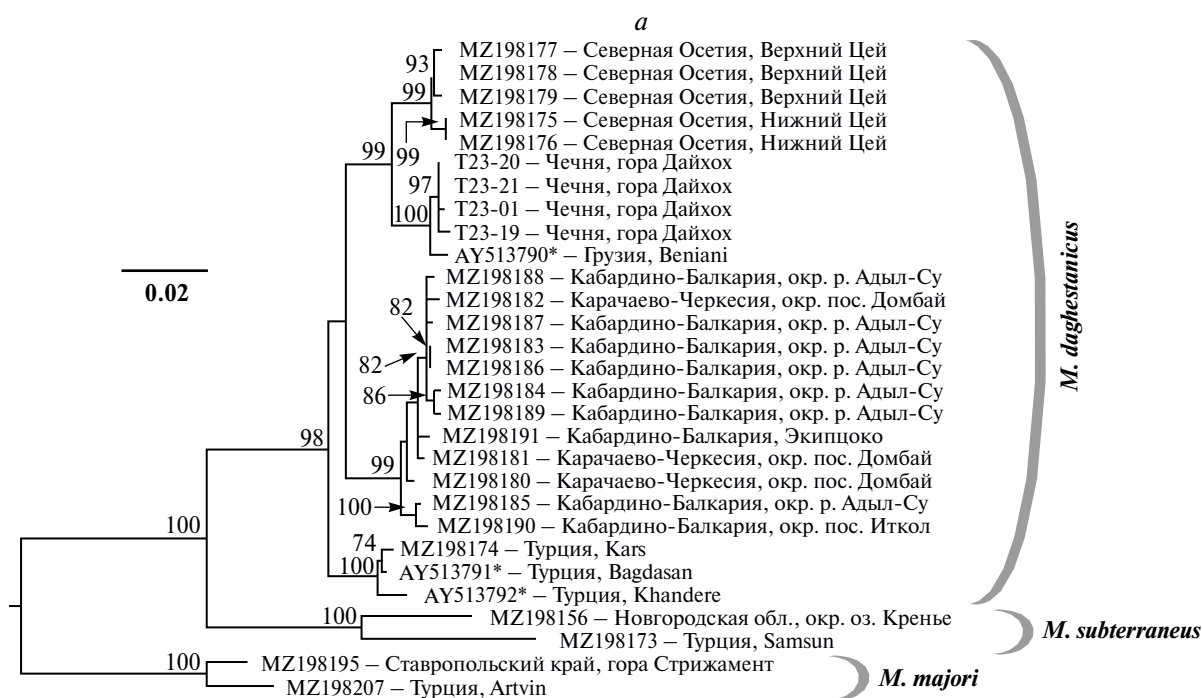


Рис. 2. ML-дендрограммы, построенные при сравнении дагестанских полевок из разных популяций и нескольких особей *M. subterraneus* и *M. majori* по полной последовательности митохондриального гена *cytb* (а), объединенной последовательности двух неперекрывающихся фрагментов ядерного гена *XIST* (б) и фрагменту 11-го экзона ядерного гена *BRCA1* (в). В узлах ветвления древ даны значения бутстреп-индекса, превышающие 70%. Для ранее опубликованных последовательностей указаны номера базы GenBank; номера без дополнительных обозначений взяты из публикации [7], номера, отмеченные звездочкой — из статьи [9]. Для гена *XIST* через запятую представлены номера, соответствующие его первому и второму отдельно просеквенированным фрагментам.

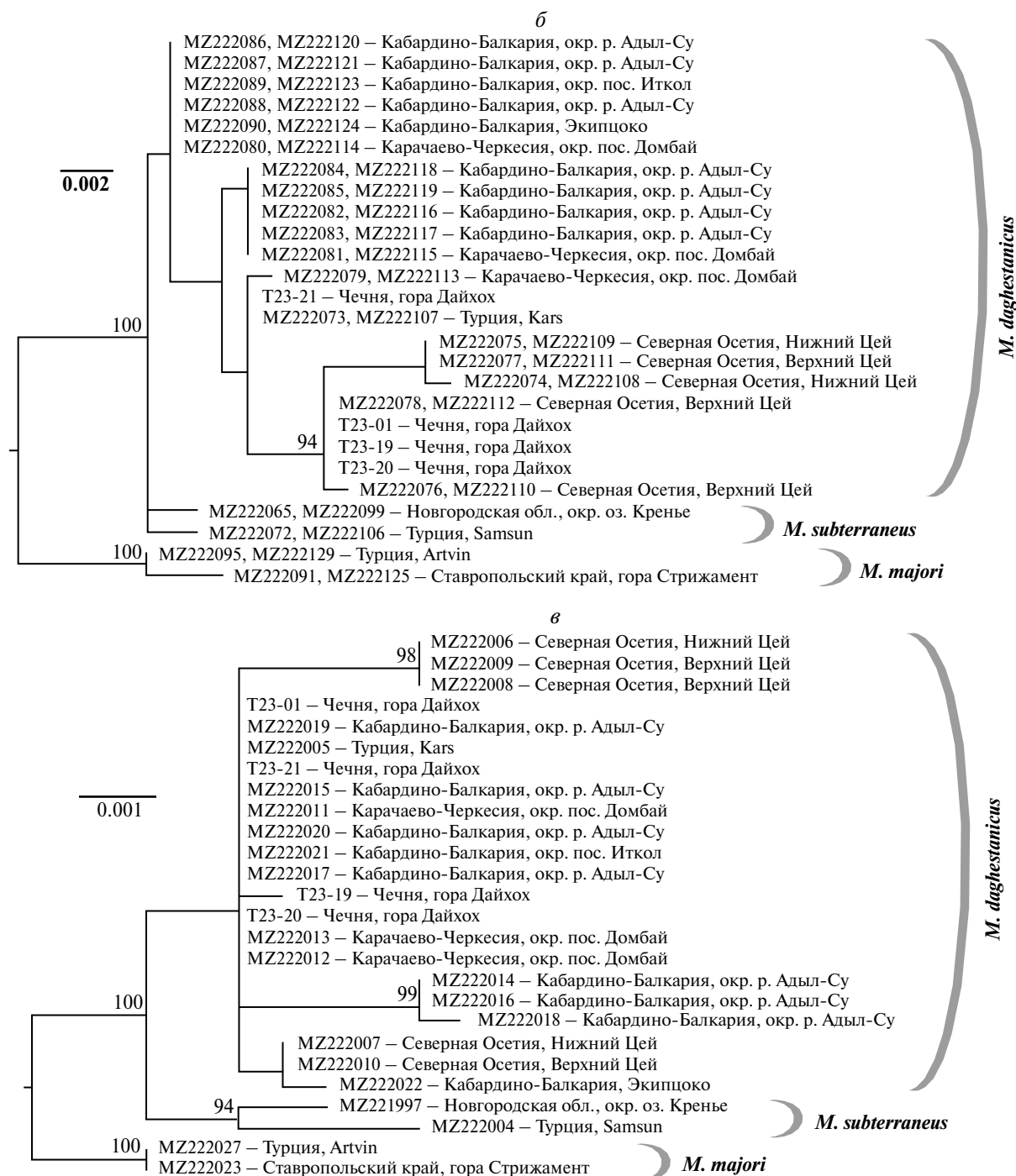


Рис. 2. Окончание.

популяции дагестанских полевков из Чечни может отражать ее сложную историю, связанную с чередованием этапов изоляции от соседних популяций и возобновлением контактов между ними. Похожий сценарий предполагался ранее для других популяций *M. daghestanicus* Северного Кавказа и Малой Азии [7, 8].

Авторы глубоко признательны Сапарбаевой

Ларисе Маасовне (КНИИ РАН) за помощь в лабораторной обработке материала.

Настоящая работа выполнена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (грант № 23-24-00329).

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы

ухода за животными и их использования были соблюдены.

Исследование одобрено Этическим комитетом ИБР РАН (протокол № 37 от 25.06.2020).

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tambovtseva V., Bakloushinskaya I., Matveevsky S., Bogdanov A. Geographic mosaic of extensive genetic variations in subterranean mole voles *Ellobius alaicus* as a consequence of habitat fragmentation and hybridization // Life. 2022. V. 12. <https://doi.org/10.3390/life12050728>
2. Bogdanov A., Tambovtseva V., Matveevsky S., Bakloushinskaya I. Speciation on the roof of the World: parallel fast evolution of cryptic mole vole species in the Pamir-Alay–Tien Shan region // Life. 2023. V. 13. <https://doi.org/10.3390/life13081751>
3. Ляпунова Е.А., Ахвердян М.Р., Воронцов Н.Н. Робертсоновский веер изменчивости хромосом у субальпийских полевок Кавказа (*Pitymys*: Microtinae, Rodentia) // ДАН СССР. 1988. Т. 298. С. 480–484.
4. Ахвердян М.Р., Ляпунова Е.А., Воронцов Н.Н. Кариология и систематика кустарниковых полевок Кавказа и Закавказья (*Terricola*, Arvicolinae, Rodentia) // Зоол. журнал. 1992. Т. 71. Вып. 3. С. 96–110.
5. Хатухов А.М., Дзуев Р.И., Темботов А.К. Новые кариотипические формы кустарниковых полевок (*Pitymys*) Кавказа // Зоол. журнал. 1978. Т. 57. Вып. 10. С. 1566–1570.
6. Загороднюк И.В. Кариотип, систематическое положение и таксономический статус *Pitymys ukrainicus* (Rodentia) // Вестник зоологии. 1988. № 4. С. 50–55.
7. Bogdanov A.S., Khlyap L.A., Kefelioğlu H. et al. High molecular variability in three pine vole species of the subgenus *Terricola* (*Microtus*, Arvicolinae) and plausible source of polymorphism // J. Zool. Syst. Evol. Res. 2021. V. 59. I. 8. P. 2519–2538. <https://doi.org/10.1111/jzs.12539>
8. Богданов А.С., Хляп Л.А., Баскевич М.И. Дифференциация и филогенетические связи трех видов полевок подрода *Terricola* (Rodentia, Arvicolinae, *Microtus*): результаты анализа фрагментов ядерных генов *BRCA1* и *XIST* // Известия РАН. Серия биол. 2020. № 6. С. 575–580. <https://doi.org/10.31857/S0002332920060028>
9. Jaarola M., Martínková N., Gündüz İ. et al. Molecular phylogeny of the speciose vole genus *Microtus* (Arvicolinae, Rodentia) inferred from mitochondrial DNA sequences // Mol. Phylogen. and Evol. 2004. V. 33. P. 647–663. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2004.07.015>
10. Малыгин В.М., Левенкова Е.С., Ахвердян М.Р., Сафронова Л.Д. Сравнение синаптомемных комплексов самцов-гибридов кавказских кустарниковых полевок (Rodentia, Microtinae, *Terricola*) в контексте изучения гибридной стерильности // Зоол. журнал. 2000. Т. 79. Вып. 3. С. 348–356.
11. Богданов Ю.Ф., Коломиец О.Л. Синаптомемный комплекс — индикатор динамики мейоза и изменчивости хромосом. М.: Т-во научн. изданий КМК, 2007. 358 с.
12. Peters A.H.F.M., Plug A.W., van Vugt M.J., de Boer P. A drying-down technique for the spreading of mammalian meiocytes from the male and female germ line // Chromosome Res. 1997. V. 5. P. 66–71. <https://doi.org/10.1023/A:1018445520117>
13. Page J., Berríos S., Rufas J.S. et al. The pairing of X and Y chromosomes during meiotic prophase in the marsupial species *Thylamys elegans* is maintained by a dense plate developed from their axial elements // J. Cell Sci. 2003. V. 116. P. 551–560. <https://doi.org/10.1242/jcs.00252>
14. Matveevsky S., Chassovnikarova T., Grishaeva T. et al. Kinase CDK2 in mammalian meiotic prophase I: Screening for hetero- and homomorphic sex chromosomes // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22. <https://doi.org/10.3390/ijms22041969>
15. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual. N. Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. 398 p.
16. Minh B.Q., Trifinopoulos J., Schrempf D., Schmidt H.A. IQ-TREE version 2.0: Tutorials and manual phylogenomic software by maximum likelihood. 2019, december 1. <http://www.iqtree.org>
17. Богданов Ю.Ф., Коломиец О.Л. Кариотипирование на основе синаптомемных комплексов и применение этого метода в цитогенетике // Генетика. 1985. Т. 21. № 5. С. 793–802.
18. Borodin P.M., Basheva E.A., Torgasheva A.A. et al. Multiple independent evolutionary losses of XY pairing at meiosis in the grey voles // Chrom. Res. 2012. V. 20. P. 259–268. <https://doi.org/10.1007/s10577-011-9261-0>
19. Earnshaw W.C., Allshire R.C., Black B.E. et al. Esperanto for histones: CENP-A, not CenH3, is the centromeric histone H3 variant // Chrom. Res. 2013. V. 21. P. 101–106. <https://doi.org/10.1007/s10577-013-9347-y>

Molecular Genetic and Meiotic Peculiarities of Caucasus Pine Voles *Microtus (Terricola) daghestanicus* in the Eastern Part of the Greater Caucasus

A. S. Bogdanov¹, M. M. Atsaeva^{2,3}, D. D. Arsanukaev⁴, S. N. Matveevsky^{3,*}

¹Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia

²Ibragimov Complex Institute of the Russian Academy of Sciences, Grozny, 344051 Russia

³Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

⁴Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

*e-mail: sergey8585@mail.ru

The high level of karyotypic and molecular genetic variability was previously detected in the Caucasus pine vole *Microtus daghestanicus*. However, populations of this species were poorly studied in the eastern part of the Greater Caucasus. To reveal their genetic peculiarities and phylogenetic relationships with other conspecific populations we analyzed a sample of Caucasus pine voles from the south of the Chechen Republic (Daikhokh Mount). The immunocytochemical study of synaptonemal complexes in meiotic prophase I demonstrated that the population belongs to the most distributed 54-chromosomal form of *M. daghestanicus*. The entire mitochondrial cytochrome *b* gene analysis showed close clustering specimens from Chechen Republic and previously studied Caucasus pine vole from northern Georgia. It indicates that all these specimens belong to a discrete genetic form. In the studied sample from Chechen Republic we revealed variability of the nuclear *BRCA1* and *XIST* genes that probably reflects a complicated history of the population associated with alternation of its isolation from neighbor populations and restoring contacts between them.

Keywords: *Microtus daghestanicus*, synaptonemal complex, molecular genetic variability, the *cytb*, *BRCA1*, *XIST* genes.