УДК 575.162:599.323.43

ПОЛИМОРФИЗМ ЦИТОХРОМА b КРАСНОЙ ПОЛЕВКИ *CLETHRIONOMYS RUTILUS* PALLAS

Переверзева В. В., Докучаев Н. Е., Примаков А. А., Дубинин Е. А.

ФГБУН Институт биологических проблем Севера ДВО РАН, г. Магадан

E-mail: vvpereverzeva@mail.ru

Проведен анализ полиморфизма участка полипептида цитохрома b красной полевки *Clethrionomys rutilus* из популяций Северного Приохотья, включая прилежащие острова, и бассейна р. Колыма. В исследованных выборках рассчитаны частоты изоформ цитохрома b. В структуре энзима обнаружены консервативные аминокислотные замены ($m_c = 1 - m_c = 3$; $z > 3.09$; $P < 0.001$), определена их локализация и степень консервативности. Проведенный анализ свидетельствует о действии стабилизирующего отбора, направленного на сохранение десяти физико-химических свойств у ряда вариантов полипептида.

Ключевые слова: красная полевка, *Clethrionomys rutilus*, ген цитохрома b (*cytb*), изоформы фермента цитохрома b (Cytb), генетическое разнообразие, филогенетический анализ.

DOI: 10.34078/1814-0998-2020-3-109-119

ВВЕДЕНИЕ

Красная полевка (*Clethrionomys rutilus* Pallas, 1779) – голарктический вид, ареал которого занимает обширные, преимущественно северные территории Евразии и Северной Америки (Shenbrot, Krasnov, 2005). Пределы Северо-Восточной Азии (СВА) красная полевка населяла уже в раннем плейстоцене (Шер и др., 1977). Во времена средне- и позднеплейстоценовых оледенений большая часть территории СВА, по-видимому, была непригодна для проживания *Cl. rutilus*. В такие эпохи ареал вида смещался на юг. При этом полевки могли сохраняться в отдельных рефугиумах, из которых в межледниковья вновь заселяли свободные северные территории.

Согласно палеонтологическим данным (Агаджанян, 1980), в каргинское межледниковье лесные (рыжие) полевки уже населяли долину р. Майн (правого притока р. Анадырь). Вероятней всего, это была красная полевка. Причем в отложениях едомной и алешкинской свит Колымы и в отложениях Чаунской равнины остатки рыжих полевок не были найдены (Там же). В последовавшее затем сартанское оледенение северные границы ареала *Cl. rutilus* сместились на юг. На Северо-Востоке Азии максимум последнего похолодания полевки переживали в рефугиумах на Камчатке и на Охотском побережье. Оледенение также привело к понижению уровня Мирово-

го океана. На месте Берингова пролива образовалась суша – так называемый Берингийский мост, соединивший Чукотку и Аляску. С окончанием оледенения красная полевка вновь заселила бассейн Анадыря, откуда по сохранявшемуся какое-то время «Берингийскому мосту» проникла на Аляску. Позднеплейстоценовое заселение Аляски красной полемкой признается большинством исследователей (Rausch, 1963; Чернявский, 1984; Cook et al., 2004; Kohli et al., 2015).

При исследованиях филогеографии различных видов млекопитающих используются данные о полиморфизме нуклеотидной последовательности гена *cytb* (Bannikova et al., 2010; Распопова, Щипанов, 2011; Abramson et al., 2012; Koh et al., 2012; Dabrowski et al., 2013; Малярчук и др., 2015; Kohli et al., 2015; Григорьева и др., 2018; Ялковская и др., 2018). Ряд авторов, основываясь на данных об изменчивости нуклеотидной последовательности гена *cytb* мтДНК красной полевки, выделили у этого вида для материковых частей суши три основные филогруппы (Iwasa et al., 2002; Abramson, Bodrov, 2008; Малярчук, 2011; Kohli et al., 2015). Мы придерживаемся классификации, предложенной Н. И. Абрамсон и С. Ю. Бодровым (Abramson, Bodrov, 2008), которые обозначили данные генетические линии *Cl. rutilus* как западная (З), восточная (В) и берингийская (Б).

Ранее на основании полиморфизма нуклеотидной последовательности фрагмента гена *cytb* нами был проведен анализ особенностей гене-

тической структуры и филогенетических связей ряда популяций красной полевки Северного Приохотья и бассейна р. Колыма (Переверзева и др., 2011, 2013а, б). Было установлено, что часть мутаций обуславливает изменение аминокислотной последовательности, вследствие чего под действие отбора попадают различные варианты белка цитохрома b (Cytb). Энзим Cytb является важным звеном метаболизма и относится к трансмембранным ферментам. Cytb имеет два окислительно-восстановительных центра: Qo связан с внешней поверхностью мембраны митохондрии, Qi – с внутренней. Сравнительный анализ строения молекулы Cytb многих видов животных показал, что трансмембранные домены наиболее вариабельны, а петлевые участки активного центра Qo – самые консервативные (Kocher et al., 1989; McClellan et al., 2005). Было выдвинуто предположение, что адаптивная эволюция митохондриальных ферментов, основанная на изменении биоэнергетики митохондрий, может определять вектор внутривидовой дифференциации (Gershoni et al., 2009). Позже было показано (Малярчук, 2011), что процесс внутривидовой дивергенции довольно редко сопровождается радикальными аминокислотными заменами, возникающими в Cytb у некоторых видов северных животных под влиянием адаптации. Исследование красных полевок из различных географических точек выявило отсутствие у них аминокислотных замен, свидетельствующих об адаптивных изменениях Cytb. Присутствие у этого вида только консервативных замен указывает на влияние стабилизирующего отбора, поддерживающего структуру данного белка (Малярчук, 2011).

Таблица 1. Количество красных полевок – носителей вариантов F2–F14 участка полипептида цитохрома b в выборках из популяций бассейна р. Колыма и Северного Приохотья

Table 1. The number of the Northern Red-backed vole carriers of F2–F14 variants of the cytochrome b polypeptide site in samples from the populations of the Kolyma River basin and Northern Priokhotye

Локальность	Объем выборки из популяции	Количество носителей изоформ энзима F2–F14
Бассейн р. Колыма	171	28
Материковое побережье Северного Приохотья		
Окрестности г. Магадан	25	8
Полуостров Кони	5	3
Бассейн р. Яма	27	8
Острова Северного Приохотья		
Талан	64	24
Недоразумения	15	14
Спафарьева	15	0
Матыйкиль	38	38
Совокупная выборка	360	123

Нами также было установлено, что большинство красных полевок североохотоморского и колымского регионов имеет вариант F1 полипептида Cytb. Был проведен анализ полиморфизма нуклеотидных последовательностей участка гена *cytb*, кодирующих изоформу Cytb F1 (Переверзева, Примаков, 2016). Предварительный анализ показал высокий уровень полиморфизма полипептида Cytb у красных полевок Северного Приохотья и бассейна р. Колыма (Переверзева, Примаков, 2015). Настоящее исследование является продолжением изучения генетического разнообразия *Cl. rutilus*. В предлагаемой работе проводится развернутый анализ полиморфизма аминокислотной последовательности участка фермента Cytb изоформ F2–F14 в некоторых популяциях красной полевки Северного Приохотья и бассейна р. Колыма и сравнение аминокислотной последовательности этого фрагмента у полевок Магаданской области, Европы, Западной Сибири, юга Дальнего Востока и Аляски.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Ранее нами был исследован полиморфизм нуклеотидной последовательности фрагмента гена *cytb* красной полевки (Переверзева и др., 2011, 2013а). В данной работе используется другой методологический подход – на основании программного обеспечения (пакета программ MEGA и TreeSAAP) анализируется полиморфизм аминокислотной последовательности фрагмента полипептида Cytb. Для генетического анализа из общей выборки 360 полевок колымского и приохотского регионов отобраны только образцы с изоформами Cytb F2–F14 (табл. 1). Места отлова

красных полевок приведены на карте в одной из наших статей (Переверзева, Примаков, 2016). Гаплотипы гена *cytb* красных полевок колымского региона и материковой части Северного Приохотья маркированы буквой «В» (восточная генетическая линия), о. Талан – «Т», о. Недоразумения – «Н» и о. Матыйкиль – «М».

Для проведения филогенетического анализа, помимо собственных данных, из GenBank были взяты сведения о нуклеотидной последовательности участка гена *cytb*, кодирующего у полевок берингийской, восточной и западной материнских линий (Iwasa et al., 2002; Cook et al., 2004; Kohli et al., 2015) полипептиды, отличные от варианта, обозначенного нами как F1. Представленные в GenBank изоформы Cytb полевок берингийской клады мы обозначили «F(Б)», восточной – «F(В)» и западной – «F(З)».

На основании данных о нуклеотидной последовательности фрагмента из 759 пар нуклеотидов гена *cytb* определены 253 аминокислоты белка Cytb, соответствующие участку от 128-й до концевой аминокислоты энзима включительно. В работе используется однобуквенное обозначение аминокислот, рекомендуемое ИЮПАК (IUPAC). Картирование анализируемого участка *cytb* проводили относительно полной нуклеотидной последовательности мтДНК *Clethrionomys regulus* (GenBank, № NC016427). В качестве внешней группы использована нуклеотидная последовательность участка гена *cytb* *Craseomys rufocanus* Sundevall, 1846 (GenBank, № GQ301944). Топология аминокислотных замен в пространственной конфигурации фрагмента фермента Cytb представлена в соответствии с N. Howell, D. M. Irwin и D. A. McClellan (Howell, 1989; Irwin et al., 1991; McClellan et al., 2005). С помощью пакета программ MEGA 6.0.2.74 (Tamura et al., 2013) определяли сайты несинонимичных нуклеотидных замен и аминокислотные последовательности обнаруженных вариантов полипептида Cytb, проводили филогенетический анализ *cytb*-гаплотипов. Для детекции филогенетических связей гаплотипов применяли дендрограммы, построенные по методу максимального правдоподобия (ML) на основании бипараметрической модели дистанций Кимуры (Tamura et al., 2013). Оценку узлов ветвления выполняли бутстреп-методом (1000 итераций). Для оценки адаптивности изменений в фрагменте гена *cytb* использовали программу TreeSAAP, которая определяет селективные воздействия в процессе кладогенеза на 31 структурное и биохимическое физико-химическое свойство аминокислот с использованием z-теста (Woolley et al., 2003). Это позволяет оценить замены аминокислот в восьми категориях значимости (mc) и определить тип отбора: при стабилизирующем отборе сохраняются консервативные аминокислотные замены ($mc = 1 - mc = 3$ при $z > 3.09$, $P < 0.001$), а при движущем – радикальные ($mc = 6 - mc = 8$ при $z > 3.09$, $P < 0.001$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные нами ранее исследования изменчивости гена *cytb* мтДНК *Cl. rutilus* позволили установить, что популяции вида, обитающие в бассейне Колымы и Северном Приохотье (за исключением особей о. Матыкиль), принадлежат к восточной материнской линии. Полевки о. Матыкиль относятся к берингийской генетической ветви (Переверзева и др., 2013а, б). У красных полевок бассейна Колымы обнаружено 57 гаплотипов гена *cytb* (GenBank, № GQ301890–GQ301943, GQ301945–GQ301947), кодирующих восемь (F1–F8) изоформ полипептида Cytb. Об-

суждался возможный эволюционный потенциал найденных вариантов фермента (Переверзева и др., 2011). У полевок Северного Приохотья найдено 37 ранее не описанных гаплотипов (GenBank, № JX885743–JX885766, HQ608514–HQ608519, HQ840372, GU251073, GU251074, GU251077, GU251085–GU251087) (Переверзева и др., 2013а). Было установлено, что у красных полевок Северо-Востока Азии и Аляски наиболее распространен вариант энзима Cytb F1 (Переверзева, Примаков, 2016). У особей *Cl. rutilus* Северного Приохотья и колымского региона, помимо F1, выявлено еще 13 изоформ белка Cytb. В общей сложности, в сумме с представленными в GenBank образцами, определено 35 вариантов аминокислотных последовательностей исследованного фрагмента Cytb (рис. 1).

Частоты полипептидных последовательностей F2–F14 представлены в табл. 2. Обнаружено, что изоформа F4 в колымской популяции является второй по частоте встречаемости после F1. Вариант F5, третий по распространенности у полевок бассейна Колымы, обнаружен также во всех исследованных материковых популяциях Северного Приохотья. Кроме того, изоформа F6, впервые найденная у полевок бассейна Колымы, выявлена и у особей из бассейна р. Яма. В табл. 2 показано, что изоформу полипептида F5 у исследованных полевок магаданского региона кодируют 10 вариантов гена, F4 и F6 – по 3 гаплотипа *cytb*. Изоформа F12 определяется нуклеотидными последовательностями гена *cytb* T2, M1 и M3, обнаруженными у полевок о-вов Талан и Матыкиль. Следует отметить, что о. Талан населяют особи восточной материнской линии, а о. Матыкиль – берингийской. В базе данных GenBank нами найдены *cytb*-гаплотипы, кодирующие у полевок ряд изоформ энзима (см. рис. 1), в том числе у особей берингийской клады варианты полипептида Cytb F4–F6 и F12. Кроме того, в GenBank были обнаружены *cytb*-гаплотипы, которые кодируют у полевок западной и берингийской клад одинаковую аминокислотную последовательность, обозначенную нами как F(3)1.

На рис. 2 показаны нуклеотидные замены в гаплотипах, кодирующих у красных полевок изоформы Cytb F4–F6, F12 и F(3)1. Варианты гена F4-*cytb* разнятся между собой 22, F5-*cytb* – 30, F6-*cytb* – 16, F12-*cytb* – 20 и F(3)1-*cytb* – 21-й нуклеотидными заменами соответственно. Полученные результаты позволяют говорить о дивергенции нуклеотидной структуры гена *cytb*, которая сопровождается конвергенцией аминокислотной последовательности фермента Cytb к данным вариантам полипептида.

Кроме F1, F5 и F6, у полевок Северного Приохотья найдены изоформы F9–F14. В популяции полевок бассейна р. Яма обнаружены ва-

	1111111222	2222333333	333333
	3445688333	3459122334	556777
	2058124247	8903607043	373589
F1	VFVTVNHIVIM	GVLATIIAIV	MAVNDL
	ВОСТОЧНАЯ КЛАДА		
F2	.S.....		
F3	..M.....		
F4	A..		
F5	T		
F6	S		
F7	T	T	
F8	T		..I..
F9	..A.....		
F10	..A.R....		
F11	..A.RV...		
F12			..T...
F13			..A.....
F(B)1	I.....		
	БЕРИНГСКАЯ КЛАДА		
F4	A..		
F5	T		
F6	S		
F12			..T...
F14	A..		..T...
F(B)1	V..		
F(B)2	VT		
F(B)3		T..	
F(B)4			..S...
F(B)5	T	T...	
F(B)6		T...	
F(B)7			..T...
F(B)8		A..	
F(B)9	AV..		
F(B)10	AVT		
F(B)11	T		G.
F(B)12		N...	
F(B)13			V
F(3)1		V..	
	ЗАПАДНАЯ КЛАДА		
F(3)1		V..	
F(3)2		V..	..V...
F(3)3		..I..V..	
F(3)4		..P..V..	
F(3)5	A..	V..	
F(3)6	T	V..	
F(3)7		V..	..L...

Рис. 1. Аминокислотные замены в изоформах фрагмента полипептида цитохрома b у красных полевок восточной, берингской и западной филогенетических линий. Замены представлены относительно аминокислотной последовательности варианта F1. Сайты замен показаны от начала полипептида цитохрома b

Fig. 1. Amino acid substitutions in isoforms of the cytochrome b polypeptide fragment in the Northern red-backed voles of the eastern, Bering, and western phylogenetic lines. Substitutions are represented relative to the amino acid sequence of variant F1. Substitution sites are shown from the beginning of the cytochrome b polypeptide

рианты F9–F11. Большинство особей *Cl. rutilus* о. Недоразумения имеют уникальный полипептид F13. По всей видимости, это иллюстриру-

ет результат синергии дрейфа генов и эффекта основателя на генофонд небольшой изолированной популяции.

Результаты кластерного анализа гаплотипов *cytb*, кодирующих у красных полевок различные изоформы фермента Cytb (F2–F14 и варианты аминокислотных последовательностей образцов, представленных в GenBank), приведены на рис. 3. Наличие трех крупных кластеров с высокими значениями бутстреп-индексов обусловлено генетической обособленностью восточной, берингской и западной материнских линий красной полевки. Кластеры полиморфны по структуре и подразделяются на субкластеры, часть из которых имеет значимые бутстреп-индексы в узлах ветвей. Варианты *cytb*, определяющие аминокислотную структуру изоформ F4–F6 и F12 (на рис. 3 отмечены *), относятся к разным субкластерам берингской и восточной клад (рис. 3). Генетическая дифференциация этих гаплотипов подтверждается высокими значениями соответствующих бутстреп-индексов, что также указывает на дивергенцию нуклеотидных последовательностей этих вариантов мтДНК.

Проведен TreeSAAP-анализ всех *cytb*-гаплотипов, включая все варианты мтДНК, кодирующие F1. Выявлены достоверные изменения десяти свойств белка ($z > 3.09$; $P < 0.001$) у вариантов полипептида F2, F4, F11, F12, F14, F(3)2 и F(3)5 (бутстреп-индексы 95, 98, 82, 73, 99, 66, 67 соответственно) полевок восточной и западной генетических ветвей. Значение индекса бутстреп-поддержки ветви всех гаплотипов полевок западной клады составляет 79. Следует отметить, что аминокислотные замены в перечисленных вариантах фермента характеризуются категориями значимости $mc = 1 - mc = 3$ (табл. 3), что соответствует консервативному типу замен. Можно предположить, что закрепление мутаций, приводящих к указанным изоформам фермента, в генофондах популяций вида произошло в результате действия стабилизирующего отбора. Кроме того, аминокислотные замены в полипептидах F5 и F6 также являются консервативными ($mc = 1 - mc = 3$). Однако значение бутстреп-индексов ветвей ML-дерева, на которых расположены кодирующие их *cytb*-гаплотипы, менее 50.

Аминокислотные замены в найденных вариантах фермента Cytb относительно F1 представлены на рис. 1. Изоформы данного фермента отличаются от варианта F1 от одной до трех аминокислотных замен. Известно, что замена аминокислоты в молекуле фермента не всегда приводит к его инактивации: консервативные замены в активном центре оказывают незначительное влияние на активность фермента, а участки вне активного центра могут претерпевать серьез-

Таблица 2. Частота вариантов полипептида цитохрома b F2–F14 в выборках из популяций красной полевки Северного Приохотья и бассейна р. Колыма

Table 2. The frequency of cytochrome b F2 – F14 polypeptide variants in samples from Northern Red-backed vole populations of Northern Priokhotye and the Kolyma River basin

Вариант полипептида	Гаплотипы гена <i>cytb</i>	Локальность	Частота полипептида
F2	B54	Бассейн р. Колыма	0.0058
F3	B20	То же	0.0058
F4	B50, B52, B53	– " –	0.0876
F5	B25, B27, B28, B32, B49	– " –	0.0349
	B61, B62, B68	Окрестности г. Магадан	0.3200
	B62, B66	Бассейн р. Яма	0.1111
	B82	Полуостров Кони	0.6000
F6	B29, B30	Бассейн р. Колыма	0.0175
	B30, B81	Бассейн р. Яма	0.0740
F7	B48	Бассейн р. Колыма	0.0058
F8	B26	То же	0.0058
F9	B70	Бассейн р. Яма	0.0370
F10	B76	То же	0.0740
F11	B80	– " –	0.0370
F12	T2	о. Талан	0.3750
	M1*, M3*	о. Матыкиль	0.9737
F13	H1	о. Недоразумения	0.9333
F14	M2*	о. Матыкиль	0.0263

*Отмечены гаплотипы красных полевок берингийской материнской линии.

ные изменения без потери функции энзима (Диксон, Уэбб, 1982). Поэтому была проанализирована локализация сайтов аминокислотных замен в структуре энзима *Cytb* для исследуемых вариантов полипептида. В табл. 3 показана степень консервативности, локализация в полипептиде *Cytb* и категории значимости (mc) аминокислотных замен. Полученные результаты свидетельствуют о наличии у красной полевки сайтов замен в полипептиде *Cytb* не только в переменных и промежуточных по степени консервативности точках, но и в петлевом участке *cd1-helix* активного центра *Qo* – наиболее консервативной части фермента. Аминокислотных замен в переменных сайтах и в участках промежуточной консервативности выявлено на порядок больше, чем в консервативных точках. Найдены одинаковые аминокислотные замены у красных полевок разных генетических линий. Данные рис. 1 и табл. 3 показывают локализацию в переменном сайте трансмембранного домена E замещения V232A, обнаруженного у экземпляров восточной (F4), берингийской (F(Б)9, F(Б)10) и западной (F(З)5) генетических клад. В переменном участке этого же домена присутствует замена M237T, найденная у особей восточной (F5, F7, F8), берингийской (F(Б)2, F(Б)5, F(Б)10, F(Б)11) и западной

(F(З)6) генетических ветвей. Особо следует отметить наличие у всех представителей западной линии V327, а у особей восточной и берингийской (за исключением одного образца) ветвей – I327. Этот сайт расположен в трансмембранном домене G и является промежуточным по степени вариативности (Howell, 1989). TreeSAAP-анализ (mc = 1 при $z > 3.09$, $P < 0.001$; β -структура) свидетельствует о консервативном характере данной замены. По-видимому, при расхождении материнских линий у предковых особей западной клады закрепился вариант V327, а у берингийской и восточной – I327 (см. рис. 1). Валин и изолейцин являются моноаминомонокарбоновыми кислотами с близкими по свойствам алифатическими радикалами (Химическая..., 1988). Возникновение у родоначальников генетических клад мутации A979G (см. рис. 1) в гене *cytb* произошло, вероятно, случайно. Закреплению вариантов V327 и I327 в разных материнских линиях полевок способствовал стабилизирующий отбор. По-видимому, V327 может претендовать на роль молекулярного маркера красных полевок западной материнской линии.

Наличие полиморфизма и дивергенции нуклеотидной последовательности гена *cytb*, сопряженной с конвергенцией к полипептидным

		3444444555	5555566666	6677777788	8888888899	9999000000	111111	1111
		8123689001	2356712889	9901122500	1445677812	4477012234	5683	
		7168568149	5754624480	3580268914	9698703224	5829540654	0905	
B1	GQ301890	AAGTTGCGCT	TCGTTAATTA	GTATGGTACT	TCTTGACAAC	TCAACCCACT	TGCC	
		F4						
		ВОСТОЧНАЯ КЛАДА						
B50	GQ301939	C..A..	C.....	C.....	T..A.....	G.....	T.	
B52	GQ301941		..C.....	..C.....	..T..A.....			
B53	GQ301942		..A.....	..CG.....	G.....			
		БЕРИНГИЙСКАЯ ЛИНИЯ						
KJ789517		.G...ATC..	G.CCT	.CG....G..	C...T	C.G...T...		
		F5						
		ВОСТОЧНАЯ КЛАДА						
B25	GQ301914			..C.....	A.....	T...		
B27	GQ301916			..C.....	A.....			
B28	GQ301917			..C.....	A.....			
B32	GQ301921	C.....		..C.....			..T.	
B49	GQ301938	C.....		..C..C...			..T.	
B61	JX885746	G...		..C.....	..C.....			
B62	JX885747			..C.....	..C.....			
B66	JX885751	A.....		..C.....				
B68	JX885753	A.....		..C...TC			C...	
B82	HQ608518			..C.....				
		БЕРИНГИЙСКАЯ КЛАДА						
KJ789537		.G...ATC..	G.CCG	..GC...G..	..C..C...	C.G.....		
KJ789538		.G...ATC..	..T..G.CCG	..GC...G..	T...	C.....		
KJ789483		.G...ATC..C	G.CCG	..C...G..	C...	C.G...T...		
KJ789515		.G...ATC..	C...G.CCG	..C...G..	C...	C.G...T...		
KJ556622		.G...ATC..	G.CCG	..C...G..	C...	C.G.....		
KJ789529		.G...ATC..	..A..G.CCG	..C...G..	C...	C.G...TG...		
KJ789572		.G...ATC..	G.CCG	..C..A..G..	C...	C.G...T...		
KJ789574		.G...ATC..	G.CCG	..C...G..	C...	C.G...T...		
		F6						
		ВОСТОЧНАЯ КЛАДА						
B29	GQ301918			..A.....				
B30	GQ301919	G.....		..A.....	T...			
B81	JX885766			..A.....	..A..T...			
		БЕРИНГИЙСКАЯ КЛАДА						
F430949		.G...ATC..	G.CCG	..A..G...	C...	C.G...T...		
		F12						
		ВОСТОЧНАЯ КЛАДА						
T2	GU251087			..A.....			..A..	
		БЕРИНГИЙСКАЯ КЛАДА						
M1	GU251073	.GA..AG...	...C.G.CCG	G..	C...	C.G.....	..A.T	
M3	GU251074	GGA..AG...	...C.G.CCG	G..	C...	C.G.....	..A.T	
KJ789506		.G...ATC..	...CG.CCG	..G...G..	C...	C.G...T...	..A..	
		F(3)1						
		БЕРИНГИЙСКАЯ КЛАДА						
KJ789504		.G...ATC..	G.CC.	..G...G..	C...	C.GG...T...		
		ЗАПАДНАЯ КЛАДА						
KJ789494		A...C		G..	C...CA...	C.GGA.....		
KJ789585		A...C	G	G..	C...C...	C.GGAT...		
KJ789595		A...		G..	C...C...	C.GGA...T.		
KJ789597		A..TC		G..	C...C...	C.GGA.....		
KJ789593		A...C		G..	C...C...	C.GGA.....		
KJ789526		...C.A...C		G..	C...C...	C.GGA.....		
KJ789543		A...C		G..	C...C...	C.GGA...C		
KJ789544		A...C		..G...G..	C...C...	CAGGA.....		
ABO72218		A...C	G	G..	C...C...	C.GGA.....		
AY309428		A...C		G..	C...C...	C.GGA.....		

Рис. 2. Гаплотипы фрагмента гена цитохрома *b* F4-, F5-, F6-, F12- и F(3)1 – особей красной полевки восточной, берингийской и западной филетических линий. Нуклеотидные замены представлены относительно последовательности варианта B1. Сайты замен показаны от начала гена цитохрома *b*

Fig. 2. Haplotypes of the cytochrome *b* gene fragment of F4-, F5-, F6-, F12 and F(3)1 individuals of the northern red-backed vole of the eastern, Bering and western phyletic lines. Nucleotide substitutions are represented relative to the variant B1 sequence. Substitution sites are shown from the beginning of the cytochrome *b* gene

Fig. 3. ML-phylogenetic tree constructed from data on the variability of the mtDNA cytochrome *b* gene fragment of the Beringian (BK), Western (3K) and Eastern (BK) genetic clades of the Northern Red-backed vole encoding various isoforms of the amino acid sequence F. Bootstrap indexes (> 50%) are indicated in the branching nodes. *Cytb* variants that determine the amino acid structure of the isoforms F4-F6 and F12 are marked with *

Таблица 3. Степень консервативности, локализация сайта и уровень значимости аминокислотных замен в изоформах полипептида цитохрома b у красной полевки

Table 3. The degree of conservatism, site localization and level of significance of amino acid substitutions in isoforms of the cytochrome b polypeptide in the Northern Red-backed vole

Степень консервативности	Участок энзима	Вариант полипептида
Консервативный	Трансмембранный домен С	F(B)1
	Qo, cd 1-helix	F2* (mc = 3), F3
	Трансмембранный домен D	F10, F11
	Трансмембранный домен F	F(B)5, F(B)6
Промежуточный	Qo, cd 2-helix	F9, F10, F11* (mc = 1), F14
	Трансмембранный домен G	F13; F(B)8, F(B)12; F(3)1*-F(3)7* (mc = 1)
	Трансмембранный домен H	F8, F12* (mc = 2–3), F14* (mc = 2–3); F(B)7; F(3)2* (mc = 2), F(3)7
	С-конец	F(B)4, F(B)11, F(B)13
Гипервариабельный	Трансмембранный домен E	F4 *(mc = 2–3), F5-F8; F(B)1, F(B)2, F(B)5, F(B)9–F(B)11; F(3)3* (mc = 1), F(3)4, F(3)5* (mc = 2–3), F(3)6
	Трансмембранный домен G	F7, F(B)3

Примечание. Варианты цитохрома b красных полевок с консервативным типом аминокислотных замен (mc – уровень значимости при $z > 3.09$; $P < 0.001$) и бутстреп-индексами на концах ветвей более 50 отмечены звездочкой. Петлевые участки фермента – cd1-helix, cd2-helix; Qo – активный центр, связанный с внешней мембраной митохондрии.

последовательностям F4, F5, F6 и F12, можно объяснить особенностями биологии красной полевки. Высокие темпы размножения и быстрая смена поколений способствуют фиксации большого числа независимо возникших мутаций. Вырожденность генетического кода обуславливает закрепление в генофонде популяций различных генотипов, детерминирующих одинаковые витальные фенотипы. Результаты проведенного анализа свидетельствуют о стохастической природе разнообразия гена *cytb* и конвергентном происхождении некоторых изоформ цитохрома b. Совокупное действие двух эволюционных факторов – высокой мутабельности и стабилизирующего отбора – может обуславливать наблюдаемый у красной полевки феномен сопряжения полиморфизма и дивергенции структуры гена *cytb* с конвергенцией к полипептидам F4, F5, F6 и F12 энзима Cytb. По-видимому, появление в популяциях полевок полиморфных F4-, F5-, F6-, F12-мтДНК-гаплотипов случайно, а закрепление – закономерно. Фермент Cytb является ключевым звеном системы клеточного дыхания, и его структура должна быть жестко детерминирована прессингом стабилизирующего отбора. Аминокислотные замены, обуславливающие различные варианты Cytb, найдены как в петлевых участках активного центра фермента, так и в трансмембранных доменах. Анализ достоверно подтверждает только консервативный тип аминокислотных замен. По всей видимости, стабилизирующий отбор отсекал все формы по-

липептида, значительно понижающие функциональную эффективность энзима.

Работа выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ № 18-04-00579а.

ЛИТЕРАТУРА

- Агаджанян А. К. Фауна млекопитающих плейстоцена Чукотки и основные этапы ее формирования // Новейшие отложения и палеогеография плейстоцена Чукотки. Москва : Наука, 1980. С. 256–268.
- Григорьева О. О., Стахеев В. В., Орлов В. Н. Митохондриальные свидетельства прошлого рефугиального распространения малой лесной мыши *Sylviaemus uralensis* Pall. (RODENTIA, MURIDAE) на северо-западном Кавказе // Генетика. 2018. Т. 54, № 3. С. 326–334.
- Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. Москва : Мир, 1982. Т. 2. С. 735–768.
- Малярчук Б. А. Адаптивная внутривидовая дивергенция (на примере гена цитохрома b животных) // Генетика. 2011. Т. 47, № 8. С. 1103–1111.
- Малярчук Б. А., Деренко М. В., Денисова Г. А. Изменчивость митохондриального генома росомыхи (*Gulo gulo*) // Там же. 2015. Т. 51, № 11. С. 1291–1296.
- Переверзева В. В., Засыпкин М. Ю., Соловеченчук Л. Л., Примаков А. А., Дубинин Е. А. Изменчивость гена цитохрома b митохондриальной ДНК в популяции красной полевки *Clethrionomys rutilus* Pallas, 1779 поймы среднего течения реки Колымы // Известия РАН. Сер. биол. 2011. № 3. С. 283–288.
- Переверзева В. В., Примаков А. А. Генетический анализ полиморфизма участка фермента цитохрома b красной полевки *Myodes rutilus* Pallas, 1779 // Чтения

памяти акад. К. В. Симакова : Материалы докл. Всерос. науч. конф. (Магадан, 24–25 нояб. 2015 г.). Магадан : СВНИЦ ДВО РАН, 2015. С. 148–149.

Переверзева В. В., Примаков А. А. Генетическое разнообразие синонимичных гаплотипов фрагмента гена цитохрома b красной полевки *Myodes (Clethrionomys) rutilus* Pallas, 1779 // Генетика. 2016. Т. 52, № 2. С. 189–197.

Переверзева В. В., Примаков А. А., Дубинин Е. А. Генетическая структура популяций красной полевки *Myodes (= Clethrionomys) rutilus* Pallas, 1779 Северного Приохотья по данным об изменчивости нуклеотидных последовательностей гена цитохрома b митохондриальной ДНК // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2013а. Т. 17, № 3. С. 435–443.

Переверзева В. В., Примаков А. А., Дубинин Е. А. Филогенетические отношения популяций красной полевки *Myodes (= Clethrionomys) rutilus* Pallas, 1779 Северного Приохотья и Колымского региона // Там же. 2013б. Т. 17, № 3. С. 444–451.

Распопова А. А., Щипанов Н. А. Изменчивость участка цитохрома b в разных хромосомных расах и популяциях обыкновенной бурозубки *Sorex araneus* L., 1758 // Генетика. 2011. Т. 47, № 4. С. 527–536.

Химическая энциклопедия / под ред. И. Л. Кнунянц. Москва : Сов. энциклопедия, 1988. Т. 1. 623 с.

Чернявский Ф. Б. Млекопитающие крайнего северо-востока Сибири. Москва : Наука, 1984. 392 с.

Шер А. В., Гутерман Р. Е., Зажигин В. С., Киселев С. В. Новые данные о позднекайнозойских отложениях Колымской низменности // Известия АН СССР. Сер. геол. 1977. № 5. С. 69–83.

Ялковская Л. Э., Зыков С. В., Сибиряков П. А. Генетическая изменчивость желтогорлой мыши (*Sylvaeomys flavicollis* Melch., 1834, MURIDAE, RODENTIA) на восточной границе ареала // Генетика. 2018. Т. 54, № 6. С. 629–638.

Abramson N. I., Bodrov S. Yu. Genetic differentiation and phytogeography of *Clethrionomys rutilus* Pallas, 1811 inferred from variation of mitochondrial cytochrome b gene / 11th International conference “Rodens et Spatium” on Rodent Biology. Myshkin, Russia, July 24–28. Moscow : VTO RAS, 2008. P. 64.

Abramson N. I., Petrova T. V., Dokuchaev N. E., Obolenskaya E. V., Lissovsky A. A. Phylogeography of the Gray Red-backed Vole *Craseomys rufocanus* (Rodentia: Cricetidae) across the distribution range inferred from nonrecombining molecular markers // Russian Journal of Theriology. 2012. Vol. 11, No. 2. P. 137–156.

Bannikova A. A., Dokuchaev N. E., Yudina E. V., Bobretzov A. V., Sheftel B. I., Lebedev V. S. Holarctic phylogeography of the tundra shrew (*Sorex tundrensis*) based on mitochondrial genes // Biological Journal of the Linnean Society. 2010. Vol. 101, No. 3. P. 721–746.

Cook J. A., Runck A. M., Conroy C. J. Historical biogeography at the crossroads of the northern continents: molecular phylogenetics of red-backed voles (RODENTIA: Arvicolinae) // Molecular Phylogenetics and Evolution. 2004. Vol. 30. P. 767–777.

Dąbrowski M. J., Pomorski J. J., Gliwicz J. Cytochrome b gene (*cytb*) sequence diversity in a *Microtus oeconomus* population from Białowieża Primeval Forest // Acta Theriologica. 2013. Vol. 58, No. 2. P. 119–126.

Gershoni M., Templeton A. R., Mishmar D. Mitochondrial bioenergetics as a major motive force of speciation // Bioessays. 2009. Vol. 31. P. 642–650.

Howell N. Evolutionary conservation of protein regions in the proton motive cytochrome b and their possible roles in redox catalysis // Journal of Molecular Evolution. 1989. Vol. 29. P. 157–169.

Irwin D. M., Kocher T. D., Wilson A. C. Evolution of the cytochrome b gene of mammals // Ibid. 1991. Vol. 32. P. 128–144.

Iwasa M. A., Kartavtseva I. V., Dobrotvorsky A. K., Panov V. V., Suzuki H. Local differentiation of *Clethrionomys rutilus* in northeastern Asia inferred from mitochondrial gene sequences // Mammalian Biology. 2002. Vol. 67. P. 157–166.

Kocher T. D., Thomas W. K., Meyer A., Edwards S. V., Paado S., Villablanca F. X., Wilson A. C. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1989. Vol. 86. P. 6196–6200.

Koh H. S., Jang K. H., In S. T., Han E. D., Jo J. E., Ham E. J., Jeong S. K., Lee J. E., Kim K. S., Kweon G. H. Genetic distinctness of *Sorex caecutiens hallamontanus* (Soricomorpha: MAMMALIA) from Jeju island in Korea: cytochrome oxidase I and cytochrome b sequence analyses // Animal Systematics, Evolution and Diversity. 2012. Vol. 28, No. 3. P. 215–219.

Kohli B. A., Fedorov V. B., Waltari E., Cook J. A. Phylogeography of a Holarctic rodent (*Myodes rutilus*): testing high-latitude biogeographical hypotheses and the dynamics of range shifts // Journal of Biogeography. 2015. Vol. 42, No. 2. P. 377–389.

McClellan D. A., Palfreyman E. J., Smith M. J., Moss J. L., Christensen R. G., Sailsbery J. K. Physicochemical evolution and molecular adaptation of the cetacea and artiodactyla cytochrome b proteins // Molecular Biology and Evolution. 2005. Vol. 22. P. 437–455.

Rausch R. L. A review of the distribution of Holarctic recent mammals / A Symposium, 10th Pacific Science Congress, Honolulu, Hawaii, 1961 / ed. J. Linsley Gressitt. Bishop Museum Press, 1963. P. 29–43.

Shenbrot G. I., Krasnov B. R. An atlas of the geographic distribution of the arvicoline rodents of the world (Rodentia, Muridae: Arvicolinae). Sofia : Pensoft Publishing, 2005. 336 p.

Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipowski A., Kumar S. MEGA-6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0.2.74 // Molecular Biology and Evolution. 2013. Vol. 30. P. 2725–2729.

Woolley S., Johnson J., Smith M. J., Grandall K. A., McClellan D. A. TreeSAAP: Selection on Amino Acid Properties using phylogenetic trees // Bioinformatics. 2003. Vol. 19, No. 5. P. 671–672.

Поступила в редакцию 22.01.2020 г.

Поступила после доработки 19.02.2020 г.

CYTOCHROME b POLYMORPHISM OF THE NORTHERN RED-BACKED VOLE *CLETHRIONOMYS RUTILUS* PALLAS

V. V. Pereverzeva, N. E. Dokuchaev, A. A. Primak, E. A. Dubinin

Institute of Biological Problems of the North, FEB RAS, Magadan

Polymorphism of the cytochrome b polypeptide segment of the Northern Red-backed Vole *Clethrionomys rutilus* from populations of Northern Priokhotye, including adjacent islands and the Kolyma river basin, was analyzed. The frequencies of cytochrome b isoforms in the studied samples were calculated. Conservative amino acid substitutions were found in the enzyme structure ($mc = 1 - mc = 3$; $z > 3.09$; $P < 0.001$), their localization and degree of conservatism were determined. The analysis shows the effect of stabilizing selection aimed at preserving ten physical and chemical properties in a number of polypeptide variants.

Keywords: Northern Red-backed Vole, cytochrome *b* (*cytb*) gene, isoforms of cytochrome *b* (*Cytb*) enzyme, genetic diversity, phylogenetic analysis.

REFERENCES

- Abramson, N. I., Bodrov, S. Yu., 2008. Genetic Differentiation and Phylogeography of *Clethrionomys rutilus* Pallas, 1811 Inferred from Variation of Mitochondrial Cytochrome b Gene, 11th International Conference "Rodens et Spatium" on Rodent Biology, Myshkin, Russia, July 24–28. Moscow, VTO RAS, 64.
- Abramson, N. I., Petrova, T. V., Dokuchaev, N. E., Obolenskaya, E. V., Lissovsky, A. A., 2012. Phylogeography of the Gray Red-Backed Vole *Craseomys rufocanus* (Rodentia: Cricetidae) Across the Distribution Range Inferred from Nonrecombining Molecular Markers, *Russian Journal of Theriology*. 11, 2, 137–156. DOI: 10.15298/rusjtheriol.11.2.04
- Agadjanyan, A. K., 1980. The Mammal Fauna of the Pleistocene of Chukotka and the Main Stages of Its Formation, *Latest Deposits, and Paleogeography of the Pleistocene of Chukotka*. Moscow, Nauka, 256–268 [In Russian].
- Bannikova, A. A., Dokuchaev, N. E., Yudina, E. V., Bobretsov, A. V., Sheftel, B. I., Lebedev, V. S., 2010. Holarctic Phylogeography of the Tundra Shrew (*Sorex tundrensis*) Based on Mitochondrial Genes, *Biological Journal of the Linnean Society*. 101, 3, 721–746. DOI: 10.1111/j.1095-8312.2010.01510.x
- Chemical Encyclopedia*, Ed. by I. L. Knunyants, 1988. Moscow, Encyclopedia, 1 [In Russian].
- Chernyavsky, F. B., 1984. Mammals of the Far North-East of Siberia. Moscow, Nauka [In Russian].
- Cook, J. A., Runck, A. M., Conroy, C. J., 2004. Historical Biogeography at the Crossroads of the Northern Continents: Molecular Phylogenetics of Red-Backed Voles (RODENTIA: Arvicolinae), *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 30, 767–777. DOI: 10.1016/S1055-7903-(03)00248-3
- Dąbrowski, M. J., Pomorski, J. J., Gliwicz, J., 2013. Cytochrome *b* Gene (*cytb*) Sequence Diversity in a *Microtus oeconomus* Population from Białowieża Primeval Forest, *Acta Theriologica*. 58, 2, 119–126. DOI: 10.1007/s13364-012-0096-7
- Dickson, M., Webb, E., 1982. Enzymes, Moscow, Mir, 2, 735–768 [In Russian].
- Gershoni, M., Templeton, A. R., Mishmar, D., 2009. Mitochondrial Bioenergetics as a Major Motive force of Speciation, *Bioessays*. 31, 642–650. DOI: 10.1002/bies.200800139
- Grigoryeva, O. O., Stakheyev, V. V., Orlov, V. N., 2018. Mitochondrial Evidence of Refugial Distribution of the Pygmy Field Mouse *Sylvaemus uralensis* Pall. (Rodentia, Muridae) in the Northwestern Caucasus, *Russian Journal of Genetics*. 54, 3, 314–321. DOI: 10.1134/S1022795418030055
- Howell, N., 1989. Evolutionary Conservation of Protein Regions in the Proton Motive Cytochrome *b* and Their Possible Roles in Redox Catalysis, *Journal of Molecular Evolution*. 29, 157–169. DOI: 10.1007/bf02100114
- Irwin, D. M., Kocher, T. D., Wilson, A. C., 1991. Evolution of the Cytochrome *b* Gene of Mammals, *Ibid.* 32, 128–144.
- Iwasa, M. A., Kartavtseva, I. V., Dobrotvorsky, A. K., Panov, V. V., Suzuki, H., 2002. Local Differentiation of *Clethrionomys rutilus* in Northeastern Asia Inferred from Mitochondrial Gene Sequences, *Mammalian Biology*. 67, 157–166. DOI: 10.1078/1616-5047-00023
- Kocher, T. D., Thomas, W. K., Meyer, A., Edwards, S. V., Paabo, S., Villablanca, F. X., Wilson, A. C., 1989. Dynamics of Mitochondrial DNA Evolution in Animals: Amplification and Sequencing with Conserved Primers, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 86, 6196–6200. DOI: 10.1073/pnas.86.16.6196
- Koh, H. S., Jang, K. H., In, S. T., Han, E. D., Jo, J. E., Ham, E. J., Jeong, S. K., Lee, J. H., Kim, K. S., Kweon, G. H., 2012. Genetic Distinctness of *Sorex caecutiens hallamontanus* (Soricomorpha: Mammalia) from Jeju Island in Korea: Cytochrome Oxidase I and Cytochrome *b* Sequence Analyses, *Animal Systematics, Evolution and Divers.* 28, 3, 215–219. DOI: <http://dx.doi.org/10.5635/ASED.2012.28.3.215>
- Kohli, B. A., Fedorov, V. B., Waltari, E., Cook, J. A., 2015. Phylogeography of a Holarctic Rodent (*Myodes rutilus*): Testing High-Latitude Biogeographical Hypoth-

- eses and the Dynamics of Range Shifts, *Journal of Biogeography*. 42, 2, 377–389. DOI: 10.1111/jbi.12433
- Malyarchuk, B. A., 2011. Adaptive Intraspecific Divergence: an Example Using the Animal Cytochrome *b* Gene, *Russian Journal of Genetics*. 47, 8, 979–986. DOI: 10.1134/S1022795411070143
- Malyarchuk, B. A., Derenko, M. V., Denisova, G. A., 2015. Mitochondrial Genome Variability in the Wolverine (*Gulo gulo*), *Ibid*. 51, 11, 1113–1118. DOI: <https://doi.org/10.1134/S1022795415090069>
- McClellan, D. A., Palfreyman, E. J., Smith, M. J., Moss, J. L., Christensen, R. G., Sailsbery, J. K., 2005. Physicochemical Evolution and Molecular Adaptation of the Cetacea and Artiodactyla Cytochrome *b* Proteins, *Molecular Biology and Evolution*. 22, 437–455. DOI: 10.1093/molbev/msi028
- Pereverzeva, V. V., Primak, A. A., 2015. The Analysis of the Gene Fragment Polymorphism and the Structure of a Part of Cytb of the Red-Backed Vole *Myodes rutilus* Pallas, 1779, *Conference Dedicated to the Memory of Academician K. V. Simakov, Magadan, Nov. 24–25*. Magadan, NES FEB RAS, 148–149 [In Russian].
- Pereverzeva, V. V., Primak, A. A., 2016. Genetic Diversity of the Cytochrome *b* Gene Fragment Haplotypes in Red-Backed Vole *Myodes (Clethrionomys) rutilus* Pallas, 1779, *Genetics Russian Journal*. 52, 2, 164–172. DOI: <https://doi.org/10.1134/S1022795416020095>
- Pereverzeva, V. V., Primak, A. A., Dubinin, E. A., 2013b. Phylogenetic Relations of the Northern Red-Backed Vole *Myodes (= Clethrionomys) rutilus* Pallas, 1779 Populations of Northern Priokhotye and the Kolyma Region, *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 17, 3, 444–451 [In Russian].
- Pereverzeva, V. V., Primak, A. A., Dubinin, E. A., 2014. Genetic Structure of Northern Red-Backed Vole (*Myodes (= Clethrionomys) rutilus* Pallas, 1779) Populations of the Northern Priokhotye Determined by Sequence Variation of the mtDNA Cytochrome *b* Gene, *Russian Journal of Genetics: Applied Research*. 4, 1, 27–34. DOI: 10.1134/S2079059714010079
- Pereverzeva, V. V., Zasyupkin, M. Yu., Solovenchuk, L. L., Primak, A. A., Dubinin, E. A., 2011. Variability of Mitochondrial DNA Cytochrome *b* Gene in the Red Vole *Clethrionomys rutilus* Pallas, 1779, Population in the Flood-Plain Middle Stream of the Kolyma River, *Biology Bulletin*. 38, 3, 231–236. DOI: <https://doi.org/10.1134/S1062359011030101>
- Raspopova, A. A., Shchipanov, N. A., 2011. Variability of a Cytochrome *b* Region in Different Chromosome Races and Populations of the Common Shrew *Sorex araneus* L., 1758. *Russian Journal of Genetics*. 47, 4, 462–470. DOI: <https://doi.org/10.1134/S1022795411030148>
- Rausch, R. L., 1963. A Review of the Distribution of Holarctic Recent Mammals, *A Symposium, 10th Pacific Science Congress, Honolulu, Hawaii, 1961*. Ed. J. Linsley Gressitt. Bishop Museum Press, 29–43.
- Shenbrot, G. I., Krasnov, B. R., 2005. An Atlas of the Geographic Distribution of the Arvicoline Rodents of the World (Rodentia, Muridae: Arvicolinae). Sofia, Pensoft Publishing, 336. DOI: 10.1016/j.mambio.2006.06.004
- Sher, A. V., Giterman, R. E., Zazhigin, V. S., Kiselev, S. V., 1977. New Data on the late Cenozoic Deposits of the Kolyma Lowland, *Proceedings of the Russian Academy of Sciences. Geological Series*. 5, 69–83 [In Russian].
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A., Kumar, S., 2013. MEGA-6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0., *Molecular Biology and Evolution*. 30, 2725–2729. DOI: 10.1093/molbev/mst197
- Woolley, S., Johnson, J., Smith, M. J., Crandall, K. A., McClellan, D. A., 2003. TreeSAAP: Selection on Amino Acid Properties using Phylogenetic Trees, *Bioinformatics*. 19, 5, 671–672. DOI: 10.1093/bioinformatics/btg043
- Yalkovskaya, L. E., Sibiryakov, P. A., Zykov, S. V., 2018. Genetic Variability in the Yellow-Necked Field Mouse (*Sylviaemus flavicollis* Melch., 1834, Muridae, Rodentia) at the Eastern Border of the Range, *Russian Journal of Genetics*. 54, 6, 643–651. DOI: <https://doi.org/10.1134/S1022795418060157>