

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ЗООЛОГИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

Бондарева Ольга Васильевна

Научный доклад об основных результатах подготовленной научно-квалификационной
работы (диссертации)

**«Молекулярные адаптации грызунов к подземному образу жизни на примере
подсемейства полеvoчьи (Arvicolinae, Rodentia)»**

06.06.01 Биологические науки

Зоология

Заведующий отделом аспирантуры
ЗИН РАН, кандидат биологических наук
Доронин И. В.

Научный руководитель,
кандидат биологических наук,
Абрамсон Н.И.

Рецензент,
доктор биологических наук,
Абрамов А.В.

Санкт-Петербург

2020

Оглавление

	Стр.
Введение	4
Постановка задачи	5
1. Обзор литературы	6
1.1. Физиологические и морфологические адаптации грызунов к подземному образу жизни	7
1.1.1. Снижение уровня базового обмена (BMR)	7
1.1.2. Кровяное давление и концентрация газа	8
1.1.3. Изменение размера и формы тела	8
1.1.4. Изменение сенсорных восприятий и ориентация	9
1.1.5. Морфологические адаптации	10
1.2. Молекулярные адаптации грызунов к подземному образу жизни	12
1.2.1. Изучение отдельных генов	12
1.2.2. Изучение митохондриальных геномов	14
2. Материалы и методы	15
2.1. Выделение ДНК	15
2.1.1. Для амплификации отдельных генов	15
2.1.2. Для секвенирования методом NGS	15
2.2. Амплификация отдельных генов методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)	16
2.3. Секвенирование	17
2.3.1. Секвенирование методом Сенгера	17
2.3.2. Получение коротких прочтений методом секвенирования нового поколения (NGS)	17
2.4. Сборка и аннотация митохондриальных геномов	17
2.5. Выравнивание	18
2.6. Оценка нуклеотидного состава митохондриальных геномов	18
2.7. Филогенетическая реконструкция	18
2.8. Оценка параллельных аминокислотных замен и их распределения	19
2.8.1. Цитохром Б	19
2.8.2. Митохондриальные геномы	19
2.9. Оценка уровня отбора	20
2.10. Моделирование третичной структуры белков	20
2.11. Предсказание сайтов фосфорилирования	20

3. Результаты и обсуждение	21
3.1. Анализ адаптивной изменчивости гена <i>cytB</i>	21
3.2. Анализ адаптивной изменчивости митохондриальных геномов	31
4. Выводы	37
5. Заключение	38

Введение

К подземным грызунам относят примерно 250 видов, проводящих всю (или почти всю) свою жизнь в подземных туннелях. Эти виды распространены по всем континентам за исключением Австралии и Антарктиды. Уход под землю помогает избежать открытых контактов с хищниками и сильных температурных колебаний, но приводит к возникновению новых стрессовых факторов: темнота, кислородная недостаточность и гиперкапния, нехватка пищи, повышенный инфекционный фон [1]. Это является причиной появления сходных морфологических признаков: развитая сенсорная система (как компенсация зрительного канала восприятия), устойчивость к гипоксии и гиперкапнии, особый метаболический паттерн (сниженная температура тела, низкий уровень обмена веществ).

Эволюционная биология подземных грызунов делает их прекрасным модельным объектом для изучения адаптаций к суровым условиям обитания. Более того, сравнение особенностей подземных грызунов (долголетие, устойчивость к гипоксии) с короткоживущими родственными видами на молекулярном уровне может помочь в понимании начальных этапов формирования процессов адаптаций [2].

Постановка задачи

Несмотря на изученность морфологических адаптаций грызунов к подземному образу жизни, молекулярные основы этого процесса остаются не до конца понятными. Особый интерес вызывает вопрос, насколько конвергентны молекулярные механизмы адаптаций у филогенетически независимых линий подземных грызунов.

В этой работе мы решили провести поиск следов молекулярных адаптаций у подземных грызунов в разных филогенетических линиях подсемейства полевочки (*Arvicolinae*, *Cricetidae*, *Rodentia*).

1. Обзор литературы

Подземные грызуны представляют собой широко распространенную группу таксонов, которые живут в основном под землей и высоко адаптированы к этой среде [3-6]. Подземная ниша, с одной стороны, защищает подземных грызунов от хищников и от колебаний окружающей среды или экстремальных условий, преобладающих над землей. Защита особенно важна в периоды повышенной уязвимости: во время отдыха, сна или размножения. Однако, с другой стороны, подземная ниша является очень специализированной и сложной. Подземные грызуны живут в условиях темного стресса и лишены большинства сенсорных сигналов, доступных над землей, сталкиваются с низким запасом продовольствия, тратят большое количество энергии на рытье [6] и подвергаются высокой патогенной нагрузке. [4].

Подсемейство полеvoчьи (Arvicolinae, Rodentia) примечательно тем, что оно является самым молодым среди грызунов, быстро эволюционирует и является одной из самых разнообразных групп, которые колонизировали почти все ландшафты и типы местообитаний в Северном полушарии. Грызуны Arvicolinae демонстрируют самую быструю задокументированную адаптивную радиацию среди современных млекопитающих. Самые ранние полеvoчьи известны с позднего миоцена (около 7-8 млн лет) как в Евразии, так и в Северной Америке [7,8]. Подсемейство насчитывает около 150 видов, сгруппированных по разным оценкам в 28-30 родов, относящихся к 8-10 трибам [9]. Число современных видов в восемь раз больше, чем в сестринском таксоне Cricetinae, который присутствует в летописи еще с раннего миоцена [10]. Arvicolinae возникла во время серии повторяющихся событий быстрого видообразования, по крайней мере, с тремя «взрывными» периодами быстрой дивергенции в течение своей эволюционной истории [11].

Внутри этой группы по меньшей мере 5 филогенетически далеких линий, включающих всего около 10 видов, демонстрируют независимый переход к подземному образу жизни. Прометеева полевка — *Prometheomys schaposchnikowi* Satunin, 1901 представляет собой самую раннюю эволюционную линию среди всех современных полеvoчьи и является единственной подземной формой среди так называемой первой волны радиации полевок [11]. Расхождение между *Prometheomys* и всеми другими полеvками, согласно молекулярному датированию, оценивается примерно в 7 млн лет [24,25]. Другие подземные линии появляются намного позже и относятся к наиболее многочисленной последней волне радиации. Среди этих линий высокоспециализированные подземные слепушонки трибы Ellobiusini с единственным родом *Ellobius* Fisher, 1814, который насчитывает 5 видов в двух подродах. Ископаемые остатки слепушонок известны на рубеже плиоцена-плейстоцена, примерно 2,5 млн лет [12]. Оценки молекулярного датирования дивергенции подродов слепушонок составляют примерно 4,5-4,8 млн лет [11,13]. Некоторые виды из разных родов в пределах самой многочисленной трибы Arvicolini (включает по разным оценкам 60-62 видов) также демонстрируют различную степень адаптации к подземному образу жизни, в частности: *Terricola subterraneus*, de

Selys-Longshamps, 1836, *Microtus pinetorum* Le Conte 1830 и *Lasiopodomys mandarinus* Milne-Edwards, 1830. Эти виды принадлежат к разным узлам в пределах трибы [14] и не являются потомками одного ближайшего общего предка. Сестринские таксоны каждого вида — это виды, обитающие на поверхности, что указывает на независимый многократный переход к подземному образу жизни в пределах этой трибы. Базальная радиация кроновых таксонов *Microtus sensu lato* (включая и *Lasiopodomys*) может быть оценена в 2,1 млн лет, поскольку, согласно известной палеонтологической летописи, непосредственные предки *Microtus s.l.* появляются по всему Северному полушарию около 1,9-2,1 млн лет назад [15].

1.1. Физиологические и морфологические адаптации грызунов к подземному образу жизни

Физиологические адаптации, которые характеризуют подземных млекопитающих, в основном связаны с выработкой тепла и адаптации к гипоксии и гиперкапнии внутри норы [4,16]. Уровень специализированных реакций на эти явления, по-видимому, тесно связан с количеством времени, которое особь проводит под землей. В то время как почва изолирует обитателей норы от экстремальных условий надземной среды, она также снижает способность животных сбрасывать тепловую нагрузку, возникающую во время нормальной метаболической деятельности или гиперактивности, связанной с копанием. Норы также обладают высокой относительной влажностью, так что испарительное охлаждение с дыхательных поверхностей или от облизывания кожи и внутренних органов в норах неэффективно, что еще больше усугубляет проблему потери тепла.

1.1.1. Снижение уровня базового обмена (BMR)

Две конкурирующие, но не исключаящие гипотезы, объясняют пониженную скорость основного обмена (BMR) млекопитающих, которые живут и добывают корм под землей [17]. Эти гипотезы предполагают, что низкий BMR подземных видов либо компенсирует огромные энергетические потребности поиска подземных кормов (гипотеза стоимости закапывания, the cost-of-burrowing hypothesis), либо предотвращает перегрев в системах с закрытыми норами (гипотеза теплового напряжения, the thermal-stress hypothesis). Анализ показал, что в засушливых районах роющие млекопитающие имеют значительно более низкий BMR, чем в нормально увлажненных. BMR подземных и роющих млекопитающих в увлажненных почвах достоверно не различаются, равно как и BMR крупных (> 77 г) подземных и роющих млекопитающих в засушливых районах. Этот вывод поддерживает гипотезу о тепловом стрессе, потому что группы, похоже, имеют одинаковые BMR, несмотря на различия в затратах

на добычу пищи. Тем не менее, мелкие (<77 г) подземные млекопитающие в засушливых районах имеют значительно более низкий BMR, чем роющие млекопитающие аналогичного размера. Учитывая высокую удельную массу метаболизма мелких животных, ожидается, что они испытывают сильный энергетический и водный стресс в засушливых условиях. В таких условиях значительно уменьшенный BMR мелких подземных видов может компенсировать огромные энергетические потребности в подземных кормах [16–19].

1.1.2. Кровяное давление и концентрация газа

Исследования на цокорах *Eospalax fontanierii* Milne-Edwards, 1867 [20] показали различия в содержании кислорода и изменения в кровяном давлении в целом у особей, проживающих на плато в Тибете. Результаты показали, что у цокоров более высокое количество эритроцитов ($8,11 \pm 0,59 (10^{12}/л)$) и концентрация гемоглобина ($147 \pm 9,85$ г/л), но гематокрит ($45,9 \pm 3,29\%$) и средний эритроцитарный объем ($56,67 \pm 2,57$ фл) были ниже, чем у других грызунов. Кислородная насыщенность в венозной крови была в 5,7 и 9,3 раза ниже, чем у пищух и крыс соответственно. В результате разница насыщения кислородом в артериальной крови и венозной крови была в 2 и 4,5 раза выше у цокоров. Также они обладали высокой устойчивостью к изменениям pH в тканях, а также способностью получать кислород из их гипоксически-гиперкапнической среды.

В лабораторных условиях *Spalax sp.* Guldenstaedt, 1770 выживал при условиях 3% O₂ и до 15% CO₂ в течение, по крайней мере, 14 часов без каких-либо побочных эффектов или поведенческих изменений [21–23]. При тех же условиях крыса через 2–4 ч погибает [21]. По сравнению с другими грызунами диффузионная способность легких подземных грызунов выше [24], что позволяет продолжать насыщение крови в легких в условиях гипоксически-гиперкапнической обстановки. Аминокислотные последовательности гемоглобина слепышей содержат много замен, которые, вероятно, повышают его сродство к кислороду [25]. В тканях типа скелетных мышц *Spalax* плотность митохондрий, капиллярная плотность и концентрация миоглобина значительно увеличена [21,24,26]. Это уменьшает диффузионное расстояние кислорода до митохондрий и позволяет эффективно доставлять его. Аналогично, гаптоглобин [4] и миоглобин [27] некоторых слепышей содержат большие количества аминокислотных замен, которые, потенциально повышают сродство к кислороду, и, следовательно, большее количество кислорода может транспортироваться в ткани из крови даже при низком капиллярном давлении.

1.1.3. Изменение размера и формы тела

Размер тела подземных грызунов зависит от среды обитания, энергетических затрат на рытье и терморегуляции [18,28]. Размер уменьшается при географическом изменении теп-

ловой нагрузки. Положительная корреляция веса с шириной (правило Бергмана) была обнаружена у *Spalax ehrenbergi* Nehring 1897, среди которых карликовые популяции встречаются в северной пустыне Негев в Израиле [16]. Наконец, экстремальный адаптивный ответ на тепловую нагрузку замечен у *Heterocephalus glaber* Rüppell 1842, который не только маленький и голый, но также имеет самую низкую температуру тела (около 32 °С) и самую плохую способность к терморегуляции среди всех известных млекопитающих [16]. Эти экстремальные приспособления не только уменьшают перегрев, но и уменьшают ежедневные энергетические траты в условиях, когда пищевые ресурсы ограничены [29].

Форма тела варьируется от в основном крысоподобной (*Tachyoryctes*) до дорсо-вентрально сплюснутой и колбасообразной формы с плоской головой и короткой массивной шеей (*Spalax*), а длина хвоста варьируется от длинной (*Heterocephalus*) до полного отсутствия (*Spalax*). Вес и длина тела колеблются от 35 г и 80 мм (*Heterocephalus glaber*) до 1500 г и 300 мм (*Bathyergus suillus* Schreber, 1782) или больше, общей длиной до 535 мм, (у *Rhizomys*). Размер варьируется в зависимости от вида, пола (самцы в основном крупнее самок), возраста, местонахождения. Морда варьируется от удлиненной до широких, плоских и ороговевших (используются для прессования почвы) (*Spalax*, *Bathyergidae*) [5].

1.1.4. Изменение сенсорных восприятий и ориентация

Некоторые органы чувств у подземных грызунов уменьшены, особенно у полностью подземных видов [30]. Слух и голосовое общение, однако, остаются важными. Глаза показывают все стадии регрессии от средней (*Spalacopus*) до маленьких (*Bathyergidae*, *Tachyoryctes*, *Ctenomys*, *Myospalax*, *Ellobius*), мелких или полностью покрытых кожей (*Spalax*). Структурно глаза варьируются от почти нормальных до частично дегенерированных (*Tachyoryctes* и *Bathyergidae*), или полностью дегенерированных (*Spalax*) [3]. Острота зрения уменьшается соответственно. Уменьшенный размер глаз может быть следствием: (а) наличия отбора на глаз меньших размеров, (б) отсутствия факторов, стимулирующих развитие зрительной системы, или (в) отрицательная эволюционная стоимость формирования больших глаз по сравнению с преимуществами поддержания остроты зрения. В соответствии с первой гипотезой, некоторые авторы рассматривали группы с чрезвычайно редуцированными глазами как наиболее приспособленных подземных млекопитающих [31,32]. Вторая гипотеза предполагает, что сокращение глаз будет объясняться отсутствием факторов, благоприятствующих отбору в направлении зрительной системы [33-35]. Наконец, последняя гипотеза связывает морфологическую регрессию глаз с эволюционным давлением, создаваемым метаболическим бременем поддержания больших глаз и нефункциональной визуальной подсистемы формирования изображений [32]. Борги с коллегами [36] обнаружили взаимосвязь между уменьшением глаз и использованием головы в качестве клина при копании у разных видов подземных грызунов. Они также обнаружили связь между типом рациона (в основном подземные ис-

точники пищи, подземные и наземные источники пищи или в основном наземные источники пищи) и размером глаз (глаза меньше, если в рационе больше подземных источники пищи), вероятно, из-за различной вероятности нападения хищников. Таким образом, хищничество будет представлять собой процесс, способствующий формированию визуальной системы у подземных грызунов, которые должны выходить на поверхность в поисках пищи или вытаскивать разрыхленную почву на поверхность головой, чтобы построить выброс.

Обоняние и обонятельная связь хорошо развиты [30]. Тактильное чувство также развито и позволяет эффективно ориентироваться в норах, особенно при быстром движении назад. Сенсорные элементы включают особые волоски (вибриссы) тела, хвоста и передних ног. У *Heterocephalus* есть головные, концевые и половые вибриссы в добавок к сенсорному хвосту. Armstrong and Quilliam (1961, [37]) подробно описали тысячи сенсорных папилл в носках *Myospalax*, которые иннервируются 15-20 нервами каждый. Помимо этого, недавние исследования показали, что *Spalax* [38] чувствительны к сейсмическим колебаниям.

Полевые и лабораторные эксперименты подтверждают, что, несмотря на сенсорные ограничения подземных грызунов и дефицит ориентиров в среде обитания, они являются чрезвычайно эффективными навигаторами и избегают ненужных высокочастотных процессов рытья. Перемещение в темноте с использованием независимой от ориентира навигации процесс, такой как интеграция пути (также называемый счислением координат, dead reckoning) может играть важную роль для подземных видов. *Spalax ehrenbergi* использует этот тип навигации в определении кратчайшего пути многолинейного лабиринта. Для подземных грызунов визуальные сигналы не имеют значения. Тем не менее, важны направленные сигналы от геомагнитного поля под землей и уже было показано, что они действуют как независимые от света ориентиры направления у *Cryptomys* и *Spalax* [39].

Лин с соавторами [40] обнаружили в лабораторных условиях удлиненную принудительную продолжительность пробуждения *Myospalax*. Более того, сон был настолько глубоким, что частые и сильные искусственные нарушения не повлияли на процессы возбуждения.

1.1.5. Морфологические адаптации

Подземная среда характеризуется специфическими особенностями, отсутствующими в наземной среде обитания. Неудивительно, что подземные виды обладают характеристиками, которые эффективны для рытья и обживания нор.

Подземные таксоны демонстрируют значительную конвергенцию в общем плане тела и специфических чертах, связанных с копанием [41]. Как отмечает Хильдебранд [42], морфологические модификации связаны, прежде всего, с необходимостью разрыхления и транспортировки строительного материала (почвы). В частности, для этого требуется инструмент для копания, способность производить и передавать значительную силу, способность переносить груз и выносливость при копании.

Когти, передние конечности

Подземные млекопитающие проявляют специализацию в области копания, сосредоточенную вокруг их зубов или когтей. У тех, кто специализируется на рытье зубами, обычно крупные, сильные, быстро растущие резцы, которые заходят основанием глубоко в челюстную кость до уровня сочленовных отростков. Нижние резцы чаще всего используются для удаления грязи [42], и поэтому они имеют тенденцию изнашиваться быстрее, чем верхние резцы или моляры. Ряд подземных видов может закрывать свои губы за зубами, не давая почве проникнуть в рот [41,42]. Многие грызуны также используют свои когти и зубы для копания. Когти при копании сжимаются с боков [42], и костная фаланга часто распространяется в коготь. Передние конечности чаще всего используются для раскапывания (хотя задние конечности часто используются для отбрасывания рыхлого грунта назад) и, следовательно, имеют быстро растущие когти, которые модифицированы для копания и быстрого роста. Некоторые виды используют свои головы или носы, чтобы пробиться в почву. *Myospalax* и *Spalax* демонстрируют этот тип рытья, и большинство из них имеют уплотненные поверхности, используемые для копания [42]. *Myospalax* также обладают коренастыми и крепкими передними конечностями и когтями для копания [43]. Тем не менее, сильно удлиненные когти могут усложнить удержания пищи (в основном в форме палочек и корней растительности), в то время как чешуйчатый коготь большого пальца восполнит этот недостаток. Более того, этот вид специализации на когте большого пальца также помогает цокорам в очистке грязи с поверхности корней.

Мышцы и скелет

Вытеснение почвы требует больших мышечных масс, а эффективная передача сил включает в себя соотношение мощных рычагов (в рычаге) к нагрузке (вне рычага). Подземные грызуны проявляют эти черты в значительно большей степени, чем их наземные сестринские виды.

Хильдебранд [42] обсуждает несколько способов копания и представляет доказательства того, что специализации, связанные с каждым способом, отражаются в скелетных и мышечных схемах каждого таксона: копание осуществляется либо (а) крепкими короткими передними конечностями с большой мускулатурой и большими когтями, которые максимизируют создаваемую силу (*Myospalax*), (б) выдающимися быстрорастущими изогнутыми резцами (*Ellobius*, *Spalax*, *Bathyergidae*, исключая *Bathyergus*, который копает передними лапами) или (в) комбинацию обоих (*Stenomyidae*). Животное очищает вырытую почву позади него, используя обе пары конечностей; он выбрасывает почву наружу с помощью передних лап, задних лап (*Bathyergidae*), разворачивается и толкает головой и передней частью стопы или используя как бульдозер голову (*Spalax*). Уникальная процедура рытья, при которой члены колонии работают вместе, есть у *Heterocephalus* [41].

Наблюдается увеличение мышечной массы и объема в частях тела, используемых для различных типов копания. Кроме того, кости, связанные с режимами копания, становятся широкими и ограниченными, отражая их функцию в качестве платформ для прикрепления мощных мышц [44,45]. Важно закрепить части тела, непосредственно не связанные с процессом копания, обеспечивая тем самым устойчивую платформу для передачи требуемой силы. Например, плечо должно быть стабилизировано, чтобы служить основой для движения передних конечностей, и большинство подземных видов обладают либо специфическими приспособлениями для такой стабилизации, либо усилением признаков, обнаруженных у их менее специализированных родственников. Тазовый пояс, в отличие от эпигея, является наименее развитой областью тела [46].

Покровы

Движение в норах и транспортировка почвы также приводят к морфологическим изменениям у подземных млекопитающих. Виды, которые являются полностью подземными, обычно строят туннели, которые лишь немного больше, чем их собственный диаметр [47]. Когда особи поворачиваются в норе, они толкают голову между задними ногами или под предплечьем, поворачивают тело на половину оборота. Это движение усиливается за счет дряблой кожи [48] и волос, которые либо отклоняются от направления движения, либо существуют в виде коротких легко изогнутых щетинок [41,48].

1.2. Молекулярные адаптации грызунов к подземному образу жизни

В молекулярных исследованиях долгое время превалировала нейтральная теория эволюции и идея того, что эволюция генов происходит независимо от окружающих условий. Изучение адаптаций зависит от количества и качества имеющейся информации. Изменение подходов, в первую очередь, связано с развитием технологий секвенирования и переходу от секвенирования по Сенгеру к методам высокопроизводительного секвенирования второго и третьего поколения.

1.2.1. Изучение отдельных генов

Изучение адаптаций отдельных генов начиналась с тех локусов, информации о которых было больше всего. Чаще всего эти локусами являлись филогенетические маркеры, что и объясняло наличие отсекументированных последовательностей у большого количества видов и внутривидовых групп. Для большинства видов млекопитающих таким локусом был митохондриальный ген цитохром В (*cytB*).

Цитохром В — ключевой компонент белкового комплекса *bc1*, вовлеченный в окислительное фосфорелирование на мембране митохондрий и синтез АТФ [49]. Синтез АТФ — важнейший метаболическим процесс. Можно предположить, что вследствие такой важной функциональной нагрузки этот ген в целом сохраняет консервативную аминокислотную последовательность. Тем не менее, изменения в экологии влекут за собой изменения в метаболической потребности организма в целом и клетки в частности. Это, в свою очередь, может изменять давление естественного отбора на белки, которые участвуют в биохимических путях клеточного дыхания.

Огромную работу по изучению влияния изменений на молекулярном уровне у подземных грызунов проделала Da Silva с коллегами [50]. Они провели анализ на четырех группах облигатных подземных грызунов: *Spalacopus*, *Ctenomys*, *Geomys* и *Heterocephalus*. При оценке уровня отбора на цитохром б оказалось, что все четыре группы показали более высокие значения синонимичных и несинонимичных замен (dN/dS) относительно наземных видов. Помимо этого, в гене были выявлены отдельные кодоны под положительным отбором, характерные только для *Ctenomys* и *Spalacopus*; только для *Ctenomys* и *Heterocephalus* и 2 позиции для всех подземных грызунов.

В работе Томаско [49] у представителей *Ctenomys* и *Spalacopus* были исследованы уже два митохондриальных маркера: *cytB* и вторая субъединица цитохром оксидаз (*COX2*). Они также обнаружили повышенное значение соотношения dN/dS в подземных группах по сравнению с наземными сестринскими видами [49].

Отдельный интерес представляют исследования подземных грызунов в условиях “двойной гипоксии”: живущих под землей на высоте около 2 тыс м. Одна из работ посвящена как раз такому грызуну: *Eospalax fontanierii* [51], эндемичному виду с плато Лёсс в Китае [52]. Три исследованные области распространения цокора охватывали градиент высоты до 2000 метров. Сравнение вариативности в аминокислотной последовательности цитохрома В между группами показало, что у животных, обитающих в высокогорье, аминокислотное разнообразие снижено и ген находится в консервативном состоянии под стабилизирующим отбором, т.е. практически неизменен среди высокогорных особей (следует отметить, что у видов с более низких участков ареала эта изменчивость среди особей была более ярко выражена).

Адаптивные свойства цитохрома В были показаны не только у грызунов, но и у других видов, вынужденных адаптироваться к специальным условиям обитания. Так, исследование этого гена у китообразных по сравнению с другими млекопитающими, показало наличие большого количества замен в матричных и трансмембранных доменах цитохрома, которые могут приводить к изменению его биохимических функций [53]. Тоже было показано и для *Hominidae*. Связывают эти различия с возросшими энергетическими затратами в неокортексе [54]. Верблюды Нового и Старого текста, приспособленные к экстремальной жаре, показали характерные изменения во всех трех субъединицах генах цитохромоксидазы: *COX1*, *COX2* и *COX3* [55].

Из перечисленных исследований можно сделать вывод, что гены митохондриального комплекса по отдельности могут быть адаптивными и изменяться при изменении энергетических потребностей организма. Однако, отдельные гены не могут показать изменение комплекса митохондриальных генов в целом. Что, в свою очередь, могут продемонстрировать работы по изучению адаптаций на целых митохондриальных геномах.

1.2.2. Изучение митохондриальных геномов

Как уже было отмечено, под землей создаются условия с пониженным содержанием кислорода и повышенным содержанием углекислого газа, следовательно, клетки млекопитающих испытывают окислительный стресс из-за гипоксии [56]. Исследование на подземных представителях двух близкородственных групп Octodontidae и Ctenomyidae: *Ctenomys* и *Spalacopus* показало наличие положительного отбора во всех митохондриальных генах, за исключением гена *ND3*. Количество функциональных (приводящих к изменениям в структуре белка) аминокислотных замен на сайт варьировало от 0,03 в *COX3* до 0,38 в *ATP8* [57]. Похожие результаты были получены при исследовании *Ochotona curzoniae* Hodgson, 1857 (вида с Тибетского плато и живущего в условиях гипоксии): в генах мтДНК нашли 186 замен, 15 из которых находятся в крайне консервативной позиции и остаются неизменными у всех других видов, взятых в анализ. Гены с заменами включают *CYTB*, *COX1*, *COX2*, *ND2*, *ND3*, *ND5* и *ND6* [58].

Исследование других млекопитающих с измененными энергетическими затратами показывает адаптивность митохондриального генома. Летучие мыши, например, используют полет как способ передвижения, что является невероятно затратным с энергетической точки зрения. Как и у птиц, для полета летучих мышей требуется скорость метаболизма, которая в 3-5 раз превышает максимум, наблюдаемый во время тренировок у наземных млекопитающих аналогичного размера [59,60]. Оценка отбора на митохондриальных генах летучих мышей [61] показала, что количество несинонимичных замен превышает синонимичные в генах *ND2*, *ND3*, *ND4L*, *ND4*, *ND5*, *ND6* и *COX3* и, следовательно, значение ω (dN/dS) достоверно выше.

Помимо перечисленных примеров, прямое влияние митохондриальных гаплотипов на приспособленность было отмечено у веслоногих рачков [62], мышей [63] и дрозофилы [64-69]. Следовательно, многие работы, проведенные на разных видах, показывают, что изменчивость митохондриальных геномов может иметь адаптивное значение. Однако, исследования подобного рода на представителях подсемейства полевочьих не проводились.

2. Материалы и методы

2.1. Выделение ДНК

Образцы мышечной и кожной ткани хранили в 96% этаноле при -20 °С в коллекции тканей и ДНК группы молекулярной систематики млекопитающих (Зоологический институт РАН). Все сиквенсы, проанализированные в рамках данной работы, были получены из материала коллекции или с открытой базы данных GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

2.1.1. Для амплификации отдельных генов

Геномную ДНК выделяли с использованием стандартного протокола солевой экстракции [70]. Выделение ДНК проводили в лаборатории группы молекулярной систематики ЗИН РАН.

2.1.2. Для секвенирования методом NGS

Гомогенизацию тканей выполняли с использованием ступки и пестика или Qiagen TissueLyser LT (Qiagen). Для большинства образцов геномную ДНК экстрагировали с помощью Diatech DNA Prep 200 (Isogen, Россия). Выделение ДНК проводилось в помещении, изолированном от пост-ПЦР-установок, с использованием рабочей станции для ПЦР (LAMSYSYSTEMS CC) и рабочей поверхности, все инструменты и пластмассы были стерилизованы УФ-светом и хлорамином-Т, чтобы избежать загрязнения. Затем была проведена ультразвуковая фрагментация общей геномной ДНК с использованием сфокусированного ультразвукового прибора Covaris S220 (Covaris). Полученную фрагментированную ДНК очищали и концентрировали с использованием парамагнитной химии на основе гранул AMPure XP (Beckman-Coulter), используя стандартный рабочий процесс. Концентрацию ДНК оценивали с помощью флуориметра Qubit (Thermo Fisher). Выделение ДНК проводили в центре геномики Сколтеха (<https://www.skoltech.ru/research/en/shared-resources/gcf-2/>).

2.2. Амплификация отдельных генов методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)

В первой части работы для лучшего разрешения дерева *Arvicolinae* при анализе изменчивости гена *cytB*, наряду с ним были использованы и семь ядерных генов: ген рака груди 1 (*BRCA1*), экзон 11; ген рецептора гормона роста (*GHR*), экзон 10; фрагмент гена лецитин-холестерин-ацилтрансферазы (*LCAT*), экзоны 2-5 и интроны 2-4; ген белка-супрессора опухолей (*PT53*), экзоны 5-7 и интроны 5-6; ген интерфоторецепторного ретиноид-связывающего белка (*IRBP*); ген фактора фон Виллебранда (*vWF*), экзон 28; и ген кислой фосфатазы типа V (*Acp5*), экзоны 2 и 3 и частичная кодирующая последовательность были амплифицированы. Все использованные праймеры перечислены в таблице 1.

Таблица 1. Праймеры, использованные в работе. Внутренние праймеры для секвенирования помечены (*).

Ген	Праймер	Последовательность (5' - 3')	Ссылка
<i>cytB</i>	L14729	GACATGAAAAATCATCGTTGTTATT	[71]
	H15985	TAGAATGTCAGCTTTGGGTGCT	[72]
<i>BRCA1</i>	F180_arv	CGGAACAGATGGGCTGAAAGTAAAG	[73]
	R1240_arv	GGCATCTGCTGCAGGTTCTGTGT	
<i>GHR</i>	arv_F	GGCGTTCATGACAACACTACAAA	[11]
	arvic_R	ATAGCCACACGAGGAGAGGAACT	
<i>LCAT</i>	LCAT F	CACCATCTTCCTGGATCTCAA	[11]
	LCAT R	AAGAAATACAGCACATGTAGGCA	
<i>PT53</i>	p53 2F	TYCCCTCAATAAGCTRRTTCTGCCA	[74]
	p53 3R	GTTTATGCCCCCATGCAGA	
<i>IRBP</i>	A3	CTGATGGGAATGCAAGCAGC	[74]
	IPL*	GACATCGCCTACATCCTCAAGCA	
	IPR*	CTCAGCTTCTGSAGGTCTYAGG	
	B2a	ATGAGGTGYTCYGTGTCCTG	
<i>vWF</i>	V1	TG TSAACCTYACSTGTGAAGCCTG	[75]
	VIF*	CTACCTCTGTGACCTTGCCCCTGA	
	VIR*	TCAGGGGCAAGGTCACAGAGGTAG	
	W1	TGCAGGACCAGGTCAGGAGCCTCTC	
<i>Acp5</i>	AP5-120fwd	AATGCCCCATTCCACACAGC	[76]
	AP5-564rev	CCCGGGAAATGGCCAATG	

2.3. Секвенирование

2.3.1. Секвенирование методом Сенгера

ПЦР-очистку проводили с использованием набора Omnix («Омникс», Россия). ПЦР-продукты секвенировали в обоих направлениях с использованием ABI BigDye версии 3.1. на автоматическом капиллярном секвенаторе Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems) в компании Евроген (<https://evrogen.ru/>).

2.3.2. Получение коротких прочтений методом секвенирования нового поколения (NGS)

Библиотеки NGS получали с использованием набора для подготовки библиотеки ДНК NEBNext Ultra II для Illumina (New England Biolabs). Полученные продукты ПЦР очищали и концентрировали с использованием гранул AMPure XP (Beckman-Coulter). Концентрацию образцов измеряли с помощью флуориметра Qubit, а контроль качества библиотек осуществляли с помощью прибора Bioanalyzer 2100 и набора DNA High Sensitivity (Agilent). Секвенирование выполняли в системе Illumina HiSeq 4000, в результате чего считывание концевых пар составляло 75 п.н. Качество ДНК проверяли с помощью Qubit, окончательное распределение длин проверок содержимого адаптера библиотек проводили с помощью Bioanalyzer2100 (Agilent). Секвенирование проводили в центре геномики Сколтеха (<https://www.skoltech.ru/research/en/shared-resources/gcf-2/>).

2.4. Сборка и аннотация митохондриальных геномов

Качество необработанных чтений оценивалось с помощью FastQC [77]. Очищение от адаптеров или фрагментов с низким качеством проводилось с помощью программы Trimmomatic [78]. Сборка *de novo* была осуществлена с использованием plasmid SPAdes [79] с настройками по умолчанию. Полученные контиги были отфильтрованы по длине, и были отобраны с наибольшим сходством по размеру с митохондриальной ДНК (с учетом длины митогенома млекопитающего примерно 16 т.п.н.). Все позиции с низким качеством и покрытием, а также фрагменты, сильно отличающиеся от эталонных митохондриальных геномов *Arvicolinae*, были заменены на N вручную. Собранные последовательности белок-кодирующих генов проверяли на содержание преждевременных стоп-кодонов вручную.

Контиги были аннотированы с помощью веб-сервера MITOS [80] с настройками по умолчанию и с учетом митохондриального генетического кода позвоночных. Границы генов были проверены и уточнены сравнением с 21 опубликованной последовательностью митогенома *Arvicolinae*.

2.5. Выравнивание

Последовательности генов *cytB*, ядерных генов и полных митохондриальных геномов были выровнены с помощью программы Mauve 1.1.1 [81], реализованной как плагин для Geneious Prime 2019.1 (<https://www.geneious.com>). Конкатенированная последовательность 13 белок-кодирующих митохондриальных генов была отдельно выровнена с использованием MAFFT 7.222 [82].

2.6. Оценка нуклеотидного состава митохондриальных геномов

Базовый нуклеотидный состав (процентное содержание каждого из нуклеотидов) был рассчитан в Geneious Prime 2019.1 (<https://www.geneious.com>). Смещение в нуклеотидном составе (GC-skew) было изучено вычисления относительных частот нуклеотидов C и G $CG3_{skew} = \frac{C-G}{C+G}$ [83,84] с помощью пакета BioSeqUtils в BioPython [85] в среде Python 3.0.

2.7. Филогенетическая реконструкция

Для анализа изменчивости *cytB* было построено филогенетическое дерево на основе конкатенированных ядерных генов, которое использовалось для анализа параллельных замен программой TreeSAAP. Наилучшее соответствие нескольких моделей замены для каждого гена оценивалось с помощью Treefinder [86] в соответствии с скорректированным информационным критерием Акаике (AICc). Байесовский анализ на основе конкатенированного выравнивания семи генов (разделенных по генам) был проведен в MrBayes 3.2.6 [87]. Каждый анализ начинался со случайных деревьев, и два независимых прогона с 4 Марковскими цепями Монте-Карло (MCMC) выполнялись для 5 миллионов поколений, с выборкой каждого 1000-го поколения. Стандартные отклонения разделенных частот были ниже 0.01, потенциальные коэффициенты уменьшения масштаба были равны 1.0, а постоянность бы-

ла исследована в Tracer v1.6 [88]. Консенсусное дерево было построено на основе деревьев, отобранных после 25% отжига.

2.8. Оценка параллельных аминокислотных замен и их распределения

2.8.1. Цитохром Б

Достоверные физико-химические аминокислотные изменения между остатками в *cytB* были обнаружены с использованием модифицированной модели MM01, реализованной в TreeSAAP v3.2 [89]. Восемь категорий (1–8) использовались для представления величины радикальных замен, из которых категории от 6 до 8 указывают на наиболее радикальные замены [90]. Значимые положительные значения (категории 6-8, $P < 0,001$) были приняты как признак значимого изменения функции белка.

Распределение синонимичных и несинонимичных замен было рассчитано между подземными и наземными видами на каждом участке отдельно и объединено по координатам домена. Значимость частоты замещения оценивалась с помощью точного критерия Фишера и множественной корректировки Холма. Все расчеты проводились в программе R v.3.4.4 [91]. Координаты домена были получены на сайте UniProt по координатам *cytB Mus musculus*: <https://www.uniprot.org/uniprot/P00158>.

Частоты использования аминокислот для каждой позиции гена *cytB* определяли с использованием всех последовательностей для выбранных видов, чтобы учесть внутривидовые вариации. Всего было проанализировано более 6 200 последовательностей: 131 для подземных видов и 6 059 для наземных видов. Аминокислотные паттерны были рассчитаны с использованием скрипта на Python 3. Статистический тест был выбран с учетом неравных размеров выборки для всего анализа.

2.8.2. Митохондриальные геномы

Оценка замен происходила программой ProtParCon (github.com/iBiology/ProtParCon) с дальнейшим поиском аминокислот, характерных только для подземных грызунов. Поиск осуществлялся с помощью рукописного скрипта на языке программирования Python 3.

2.9. Оценка уровня отбора

Количество несинонимичных (dN) и синонимичных (dS) замен, а также ω (их соотношение) были рассчитаны с использованием codeml, реализованного в PAML4 [92]. Вариация значений ω оценивалась по разным ветвям независимо (free branch ratio) [93]. Программа запускалась 5 раз, после чего для анализа выбиралось медианное значение каждого вида. Различие значений ω в группах проверяли с помощью теста Вилкоксона в программе R v.3.4.4 [91] с уровнем значимости 0,05.

Кроме того, для каждого подземного вида (или группы видов для *Ellobius*) был проведен отдельный анализ по ветвям (branch). Подразделение на анализируемые группы производилось по принципу выбора филогенетических ближайших наземных таксонов для сравнения ω и более удаленных как внешняя группа.

2.10. Моделирование третичной структуры белков

Мы смоделировали основанные на гомологии структуры *cytB* как части комплекса *bc1* из *Lemmus sibiricus* Kerr 1792. и *Ellobius lutescens*. Общая архитектура комплекса *bc1* мало различается по кристаллическим структурам у разных организмов, от дрожжей до нескольких видов млекопитающих [94,95], что оправдывает моделирование по гомологии. Мы брали за основу модель кристаллической структуры и последовательности белков комплекса цитохрома *bc1* из *Bos taurus* с разрешением 2,4 Å (идентификатор банка данных по белкам: 1NTM [96]). Затем мы использовали modeller (выпуск 9.22) [97] для создания структур гомодимера *bc1*, используя последовательность *cytB* из соответствующего организма, но сохраняя другие части комплекса из *Bos taurus*. Мы приняли протокол автомоделирования с настройками по умолчанию. Модели были наложены на 1NMT, и замены были проанализированы визуально в PyMOL v.2.0 (Schrödinger, LLC), который также использовался для построения рисунка. Трансмембранные участки комплекса оценивали с помощью веб-сервера OPM [98].

2.11. Предсказание сайтов фосфорилирования

Чтобы предсказать сайты фосфорилирования, во всех случаях мы использовали два разных инструмента — NetPhos 3.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) [99] и GPS 5.0 (<http://gps.biocuckoo.cn/online.php>) [100].

3. Результаты и обсуждение

3.1. Анализ адаптивной изменчивости гена *cytB*

В нашем анализе мы использовали 62 последовательности *cytB* для видов Arvicolinae, которые представляют все основные рода и трибы. Среди них несколько филогенетически неродственных видов, перешедших к существованию в подземной среде. Мы включили в анализ виды из двух подродов рода *Ellobius* Fisher, 1814, монотипический *Prometheomys schaposchnikowi* Satunin, 1901 и виды *Lasiopodomys mandarinus* Milne-Edwards, 1871, *Terricola subterraneus* de Selys-Longchamps, 1836 и *Microtus pinetorum* Le Conte, 1830 как представителей подземных грызунов. Мы сравнили эти таксоны с наземными представителями из 22 родов (рис. 1).

С помощью TreeSAAP мы получили список всех значимых замен (категории 6-8) для изучаемых видов в филогенетическом контексте, поскольку последовательности анализировались с учетом филогенетического положения вида на дереве. Из списка значимых замен мы выбрали те, которые встречаются по крайней мере у трех из подземных видов, но отсутствуют во всех наземных видах. Мы нашли три замены, которые удовлетворяли нашим критериям: Ser57Pro, Asp214Asn и Ile338Val (рис. 1). Замена Asp214Asn был обнаружена также и у специализированных подземных грызунов из других семейств.

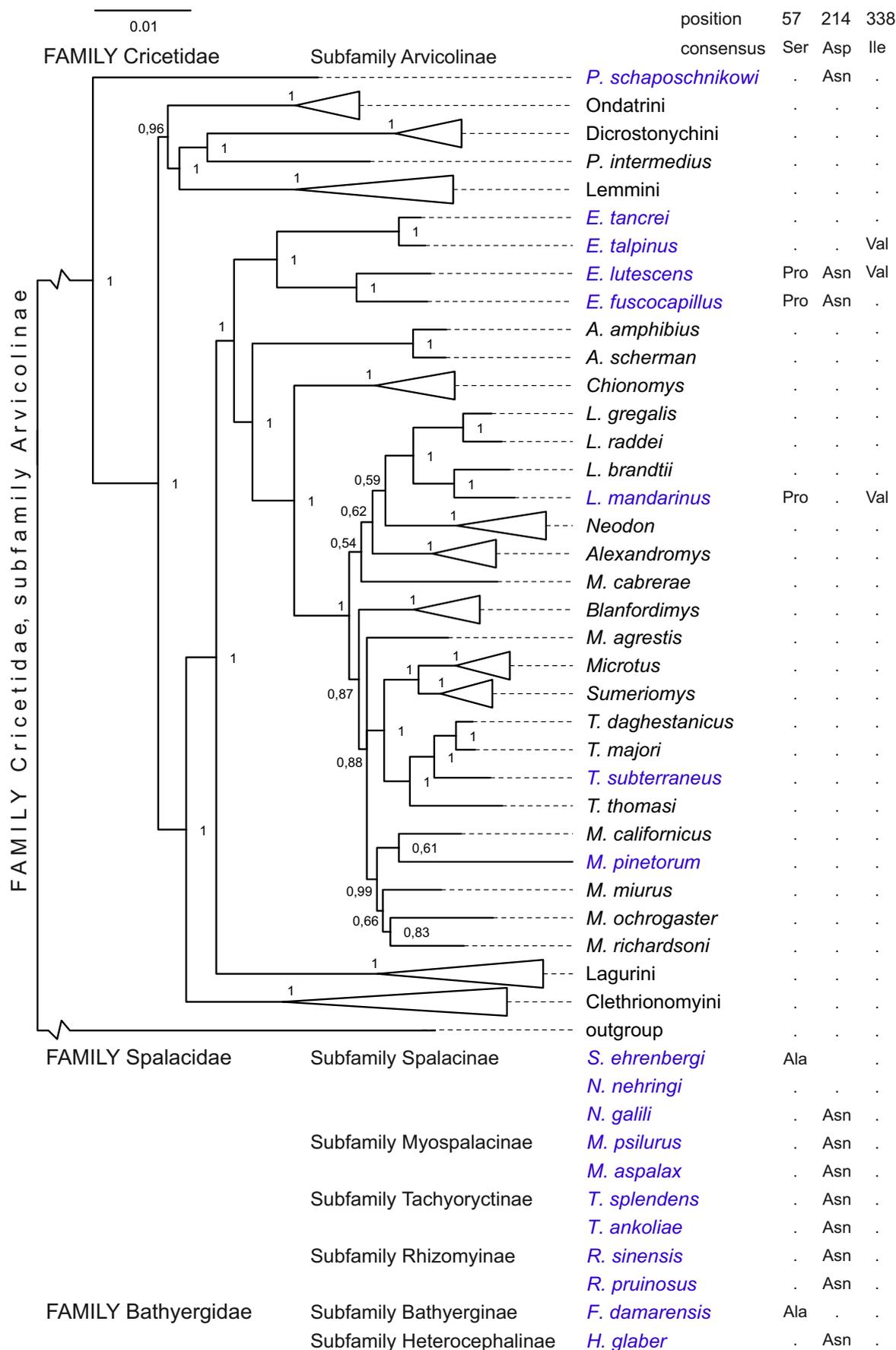


Рисунок 1. Филогенетическое дерево взятых в анализ видов. Указаны аминокислотные замены, характерные для подземных видов. Подземные виды отмечены синим цветом.

Для рассмотрения внутривидового аминокислотного полиморфизма на участках, идентифицированных TreeSAAP, был взят расширенный набор данных, состоящий из 6059 последовательностей *cutB* для наземных видов и 131 для подземных видов. Этот набор данных включает все, что было в базе данных Genbank по всем взятым в анализ видам на август 2020 года. Сравнение частот аминокислот на участок выявило более 60 участков, которые существенно различаются между подмножествами подземных и наземных видов (таблица 2). Среди них были замены 57 и 338.

Таблица 2. Сайты с достоверным отличием частоты использования аминокислот у наземных и подземных видов. Аминокислоты приведены в универсальной однобуквенной кодировке. Holm – значение *p*-value после поправки на множественное тестирование методом Холма.

Позиция	Holm	Наземные виды	Подземные виды
3	0,003	A:0,00388, I:0,67137, L:0,00071, M:0,00141, N:0,00035, S:0,00106, T:0,00035, V:0,32017, Y:0,00071	F:0,0177, I:0,95575, V:0,02655
4	0,003	A:0,00035, F:0,00105, I:0,97484, L:0,00175, M:0,01363, N:0,00035, T:0,00035, V:0,00769	I:0,61062, M:0,36283, T:0,02655
10	0,003	L:0,99935, M:0,00065	L:0,97345, M:0,02655
11	0,016	A:0,00032, F:0,00032, I:0,99132, L:0,00032, M:0,00257, S:0,00064, V:0,00289, Y:0,00161	I:0,95575, M:0,00885, T:0,00885, V:0,02655
13	0,003	I:0,8445, K:0,00032, L:0,00664, M:0,1476, V:0,00032, W:0,00063	I:0,62832, L:0,31858, M:0,0531
17	0,003	A:0,14015, I:0,00031, S:0,85741, T:0,00153, V:0,00061	A:0,00885, S:0,99115
23	0,003	A:0,83373, R:0,00027, S:0,00348, T:0,16252	A:0,55814, T:0,44186
33	0,003	C:0,00212, F:0,99618, I:0,00021, L:0,00085, S:0,00021, V:0,00042	F:0,95385, L:0,04615
40	0,018	C:0,99938, F:0,00041, W:0,00021	C:0,98462, G:0,00769, W:0,00769
42	0,003	A:0,01348, F:0,00099, I:0,85431, L:0,00079, M:0,09197, T:0,00634, V:0,03211	A:0,04615, F:0,02308, I:0,67692, S:0,01538, T:0,22308, V:0,01538
43	0,003	A:0,00118, D:0,00039, I:0,75666, M:0,00887, T:0,02189, V:0,211	I:0,36154, M:0,05385, T:0,16923, V:0,41538
46	0,01	I:0,06471, L:0,93472, S:0,00019, T:0,00038	L:1

Продолжение на следующей странице

Таблица 2 — продолжение

Позиция	Holm	Наземные виды	Подземные виды
50	0,005	F:0,99946, I:0,00018, L:0,00018, S:0,00018	F:0,97692, I:0,01538, S:0,00769
56	0,003	I:0,00034, S:0,00272, T:0,99694	P:0,00769, S:0,04615, T:0,94615
57	0,003	A:0,00136, L:0,00034, P:0,00119, S:0,99643, Y:0,00068	P:0,0458, S:0,9542
60	0,003	A:0,38586, I:0,00034, S:0,51283, T:0,10097	A:0,63359, S:0,32824, T:0,03817
66	0,008	L:0,00068, V:0,99932	I:0,01527, V:0,98473
67	0,003	A:0,49248, S:0,00051, T:0,50668, V:0,00034	A:0,9771, T:0,0229
69	0,003	I:0,99966, L:0,00034	I:0,9771, M:0,0229
82	0,003	A:0,01129, G:0,00034, L:0,06625, M:0,91571, T:0,00624, V:0,00017	L:0,30769, M:0,69231
102	0,003	I:0,23305, L:0,00101, M:0,39155, V:0,37439	I:0,0687, V:0,9313
118	0,003	F:5e-04, I:0,65786, M:0,00151, N:0,00017, V:0,33995	I:0,9771, V:0,0229
133	0,003	F:0,00033, L:0,99967	I:0,01527, L:0,9771, R:0,00763
149	0,005	L:1	L:0,98462, M:0,01538
160	0,003	L:0,99983, V:0,00017	I:0,02308, L:0,97692
162	0,003	E:0,99745, K:0,00255	E:0,89231, K:0,10769
171	0,003	D:0,99557, E:0,00085, N:0,00306, Y:0,00051	D:0,88462, N:0,11538
178	0,005	F:0,99983, V:0,00017	F:0,98462, L:0,01538
194	0,003	F:0,37632, L:0,6157, M:0,00799	L:1
203	0,003	A:0,00036, K:0,00054, S:0,00018, T:0,99893	S:0,02308, T:0,97692
209	0,005	A:0,06304, I:0,00322, M:0,00036, P:0,00018, S:0,10244, T:0,82611, V:0,00466	S:0,03077, T:0,96923
212	0,003	D:0,00018, N:0,99982	D:0,01538, K:0,03846, N:0,94615
215	0,003	A:0,86109, S:0,01828, T:0,12063	A:0,98462, T:0,01538
221	0,003	H:0,99424, P:0,00558, Y:0,00018	H:0,88462, P:0,11538
226	0,003	I:0,6858, M:0,00108, T:0,00054, V:0,31258	I:0,33077, M:0,00769, T:0,02308, V:0,63846

Продолжение на следующей странице

Таблица 2 — продолжение

Позиция	Holm	Наземные виды	Подземные виды
232	0,003	A:0,11343, D:0,00018, G:0,00252, I:0,02485, N:0,00018, V:0,85884	A:0,32308, I:0,03077, V:0,64615
233	0,003	F:0,00144, I:0,00252, L:0,99586, Q:0,00018	F:0,03077, L:0,96923
234	0,003	F:0,02035, I:0,91682, L:0,05221, M:0,0027, T:0,00018, V:0,00774	F:0,00769, I:0,66154, L:0,30769, M:0,02308
237	0,003	K:0,00252, L:0,00036, M:0,96307, S:0,0054, T:0,0281, V:0,00054	A:0,26154, K:0,12308, M:0,57692, T:0,01538, V:0,02308
238	0,003	A:0,4351, D:0,00018, G:0,3982, S:0,01242, T:0,0036, V:0,1505	A:0,72308, T:0,26923, V:0,00769
239	0,003	F:0,36712, L:0,63036, S:0,00234, V:0,00018	F:0,65385, L:0,31538, S:0,03077
240	0,003	I:0,00018, K:0,00072, M:0,99856, Q:0,00018, T:0,00036	K:0,10769, M:0,87692, T:0,01538
241	0,003	I:0,99027, M:0,00018, N:0,00036, T:0,00504, V:0,00414	I:0,67692, M:0,27692, T:0,03846, V:0,00769
243	0,003	A:0,11107, G:0,00018, N:0,00018, T:0,32005, V:0,56852	A:0,3, T:0,65385, V:0,04615
248	0,003	D:0,99802, E:0,00018, H:0,00018, K:0,00018, N:0,00144	D:0,9, N:0,1
249	0,003	A:0,06564, I:0,48007, L:0,00054, M:0,00036, T:0,00343, V:0,44995	A:0,23256, F:0,00775, I:0,75194, T:0,00775
256	0,003	D:0,00036, F:0,04833, Y:0,9513	F:0,28319, Y:0,71681
266	0,003	A:0,43584, P:0,56379, T:0,00037	A:0,00893, M:0,02679, P:0,96429
275	0,016	I:0,00019, L:0,99926, M:0,00019, P:0,00019, S:0,00019	I:0,01802, L:0,98198
281	0,039	L:0,99907, V:0,00093	L:0,98198, V:0,01802
288	0,027	G:0,00019, L:0,99907, M:0,00037, V:0,00037	L:0,98198, V:0,01802
296	0,003	L:0,99963, P:0,00019, V:0,00019	L:0,97297, M:0,02703
299	0,003	F:0,00167, L:0,79117, M:0,00056, S:0,00111, V:0,20549	F:0,00901, I:0,00901, L:0,94595, S:0,02703, V:0,00901
300	0,003	I:0,9358, M:0,00037, N:0,00019, T:0,00019, V:0,06346	I:0,68468, V:0,31532

Продолжение на следующей странице

Таблица 2 — продолжение

Позиция	Holm	Наземные виды	Подземные виды
302	0,003	A:0,99207, N:0,00019, S:0,0058, T:0,00193	A:0,81081, T:0,18919
303	0,003	A:0,0642, D:0,00039, F:0,23856, I:0,03491, L:0,66001, M:0,00019, R:0,00019, V:0,00155	F:0,01802, L:0,98198
304	0,003	I:0,00019, L:0,42658, M:0,57148, N:0,00019, Q:0,00019, V:0,00116, Y:0,00019	I:0,01802, M:0,98198
305	0,01	P:0,99942, T:0,00058	P:0,98198, R:0,01802
306	0,003	F:0,03052, H:0,04976, I:0,0344, L:0,8206, M:0,00739, S:0,00019, T:0,00019, Y:0,05695	F:0,90991, I:0,00901, L:0,08108
311	0,045	K:0,99903, N:0,00058, P:0,00019, V:0,00019	E:0,00901, K:0,98198, N:0,00901
314	0,01	A:0,35146, F:0,00019, G:0,5193, L:0,00019, S:0,00253, T:0,12632	A:0,55856, G:0,36937, T:0,07207
324	0,02	C:2e-04, I:0,05851, L:0,00078, M:0,91037, Q:2e-04, V:0,02994	L:0,00901, M:0,95495, V:0,03604
325	0,003	H:2e-04, P:2e-04, Y:0,99961	F:0,01802, Y:0,98198
327	0,045	I:0,92446, L:0,0012, M:2e-04, T:0,00381, V:0,07033	I:1
329	0,003	A:0,001, M:6e-04, T:2e-04, V:0,99819	I:0,01802, T:0,03604, V:0,94595
331	0,003	D:1	D:0,96364, N:0,03636
334	0,003	A:0,00143, I:0,70123, L:2e-04, T:0,0135, V:0,28364	I:0,94595, L:0,00901, T:0,02703, V:0,01802
335	0,008	L:1	F:0,01802, L:0,98198
338	0,003	I:0,99666, M:0,00022, N:0,00022, V:0,00289	I:0,94595, V:0,05405
349	0,003	A:0,01107, I:0,89657, M:0,0131, T:0,01265, V:0,06662	I:0,64865, L:0,01802, M:0,32432, V:0,00901
353	0,003	A:0,04928, H:0,00023, I:0,0636, M:0,38653, P:0,00023, S:7e-04, T:0,47407, V:0,02535	A:0,01802, L:0,00901, T:0,63063, V:0,34234

Продолжение на следующей странице

Таблица 2 — продолжение

Позиция	Holm	Наземные виды	Подземные виды
357	0,01	A:0,98307, G:0,00072, L:0,00119, S:0,00024, T:0,01479	A:0,93694, G:0,01802, T:0,04505
360	0,003	A:0,77274, E:0,00024, S:0,00048, T:0,22654	A:0,07207, T:0,92793
365	0,003	F:0,60583, I:0,00025, L:0,39316, S:0,00051, V:0,00025	F:0,03604, L:0,95495, P:0,00901
366	0,003	I:0,00026, M:0,99974	M:0,98198, T:0,01802
369	0,014	A:0,91371, G:0,00026, S:0,07742, T:0,00782, V:0,00078	A:1
371	0,003	I:0,00999, K:0,00053, L:0,00053, M:0,97529, T:0,0071, V:0,00657	A:0,00901, I:0,00901, L:0,03604, M:0,82883, V:0,11712
375	0,003	D:0,29643, I:0,00136, K:0,00027, N:0,6853, R:0,00027, S:0,01309, Y:0,00327	D:0,05455, N:0,94545
377	0,003	L:0,78128, M:0,21844, R:0,00028	L:1
379	0,003	L:0,98892, M:0,01049, R:3e-04, V:3e-04	L:0,67273, M:0,32727
380	0,003	D:0,97739, E:0,00428, N:0,01803, T:0,00031	D:0,66364, N:0,33636

Замена серина на пролин в остатке 57 у подземных грызунов потенциально удаляет сайт фосфорилирования. Мы использовали два разных метода, чтобы оценить статус фосфорилирования этого сайта. Сервер NetPhos 3.1 предсказал фосфорилирование киназой *CDC2* с оценкой 0,518, GPS 5.0 предсказал киназы *AGC*, *PKN* и *PKN1* с оценкой 65,363. Предсказания типа киназы не согласуются друг с другом, однако все прогнозы указывают на высокую вероятность фосфорилирования этого сайта. Те же методы не предсказывали фосфорилирование для Asp214, и, насколько нам известно, ни Ile, ни Val не могут быть фосфорилированы.

Нуклеотидная замена в положении 338 (ATT > GTT), приводящая к замене Ile338Val, была обнаружена как вероятный патоген в базе данных ClinVar NCBI и связана с раковыми процессами: www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/143898/.

Мы смоделировали структуру *cytB*, чтобы изучить возможный структурный эффект замен (рис. 2A). Согласно нашей модели, Ser57 обращен к межмембранному пространству митохондрий. Он расположен на неструктурированном сегменте петли, охватывающем остаток 54–60. Эта петля контактирует с той же петлей на втором мономере цитохрома *bc1* в комплексе (рис. 2B). В отличие от Ser57Pro, замещение Asp214Asn находится на петле, обращенной к матрице митохондрий. Он контактирует с N-концом субъединицы VII комплекса убихинол-цитохром с редуктазы III (UQCRCQ) (рис. 2C). Замена Ile338Val находится на гра-

нице раздела α -спиралей в трансмембранной области комплекса (рис. 2D). Смоделированная структура показывает, что эта замена благоприятствует другому ротамеру Пе350, который соседствует с остатком 58 UQCRQ.

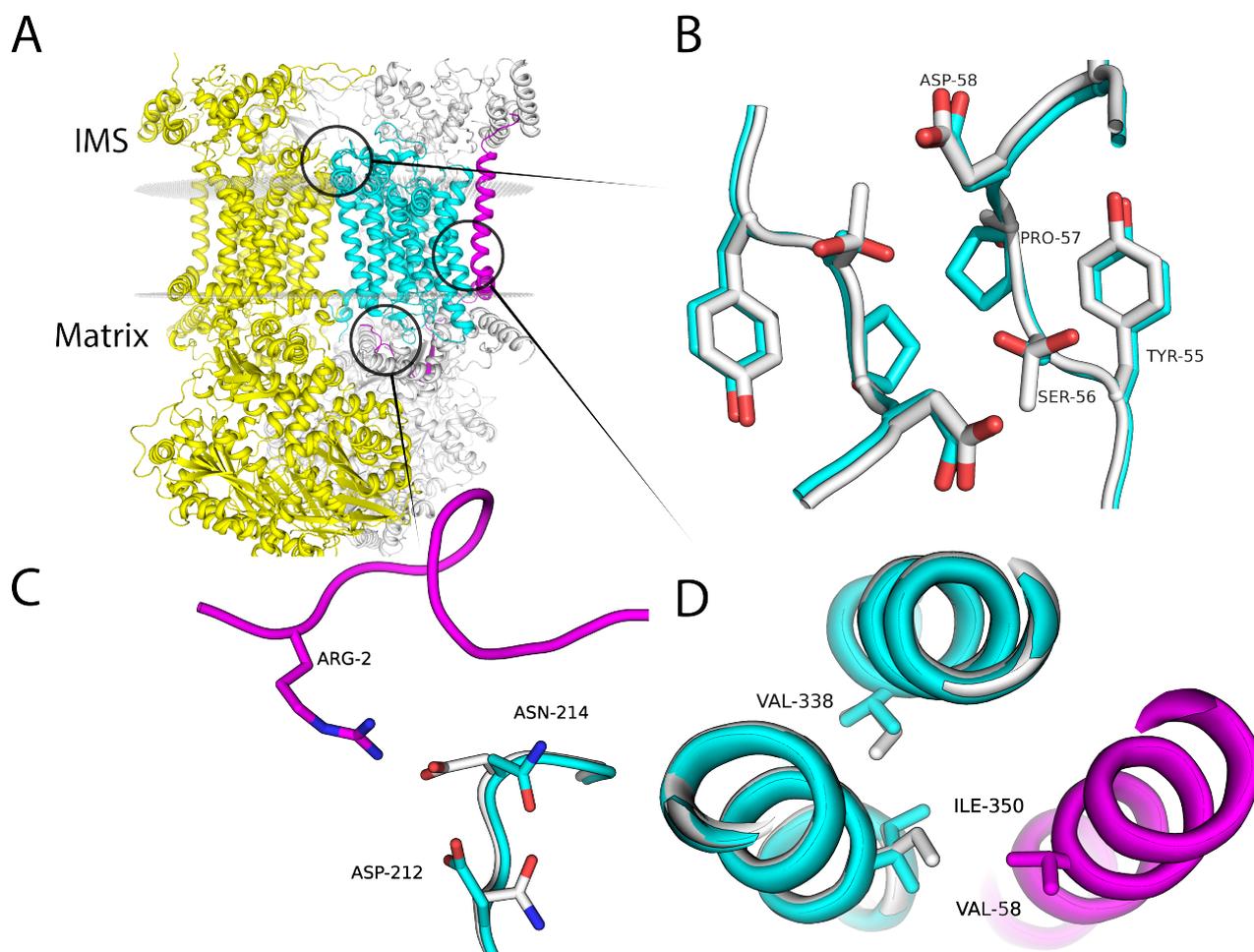


Рисунок 2. Структурная модель замен в комплексе цитохрома *bc1*. **А.** Обзор гомодимера цитохрома *bc1*. Цитохром Б — голубой, UQCRQ - пурпурный. Второй мономер окрашен в желтый цвет. Места замены выделены кружками. IMS — межмембранное пространство. **В.** Увеличенные структуры *E. lutescens* и *L. sibiricus*, показывающие замену Ser57Pro. Модель *E. lutescens* голубая, *L. sibiricus* — белая. **С.** Замена Asp214Asn и его взаимодействие с N-концом UQCRQ (пурпурный) **Д.** Замена Пе338Val и соседняя цепочка UQCRQ (пурпурный)

Оценка значений ω (отношение dN/dS) у взятых в анализ видов показала, что они были выше для подземных, чем для наземных таксонов (рис. 3) при расчете методом free brach. Значения у подземных грызунов колебались от 0,023 до 0,247, а у наземных видов от 0,001 до 0,170. Средние показатели по группе составили 0,087 и 0,045 соответственно.

Несмотря на то, что разница между средними значениями была незначительной, наблюдалась тенденция к ослаблению очищающего отбора у подземных грызунов. Эта тенденция также наблюдалась при применении branch модели в PAML, то есть анализу отбора по каждому из подземных грызунов независимо. Почти у всех подземных видов наблюдаются более

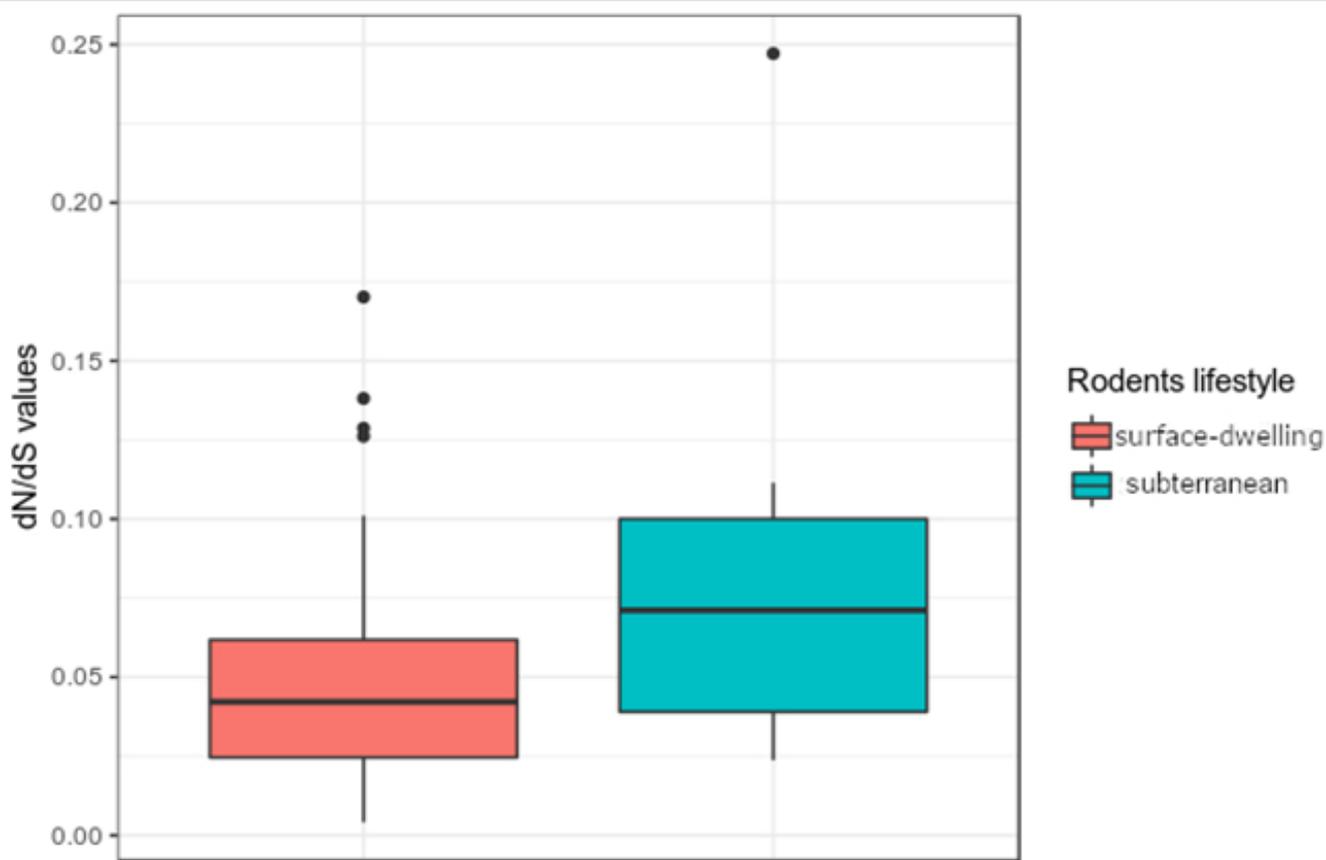


Рисунок 3. Сравнение значения dN/dS у подземных и наземных грызунов

высокие значения ω по сравнению наземными, за исключением *Terricola subterraneus* (рис. 4, таблица 3). Эта разница варьировала от 1 (*Microtus pinetorum*) до 5 раз для *Lasiopodomys mandarinus*. Все виды показали достоверные различия по сравнению с нейтральной моделью (b_neut) на ветвях, что указывает на адаптивные процессы в гене *cytB*. Достоверные различия между ветвями foreground (подземные виды) и backgrounds (наземные виды) были для видов *Ellobius*, *Lasiopodomys mandarinus* и *Terricola subterraneus*.

Таблица 3. Оценка ω в PAML с использованием ветвящейся модели. Fg — foreground branch, Bg — background branch. Ветви обозначены цветом на рисунке 4. b_free — модель независимого расчета по ветвям, b_neut — нейтральная модель.

Подземные виды	Fg	Bg	b_free / M0	b_free / b_neut
<i>Ellobius sp.</i>	0,0642	0,0243	2,33E-06	4,76E-81
<i>L. mandarinus</i>	0,1325	0,0269	4,69E-05	0,00024
<i>M. pinetorum</i>	0,0233	0,0224	0,9327	4,62E-24
<i>P. schaposchnikowi</i>	0,0617	0,0356	0,0711	1,26E-09
<i>T. subterraneus</i>	0,0071	0,0343	0,05	2,48E-17

Кроме того, мы рассчитали распределение замен в каждом сайте *cytB* отдельно и объединили по координатам домена. Анализ по сайтам показал три позиции (таблица 4) со

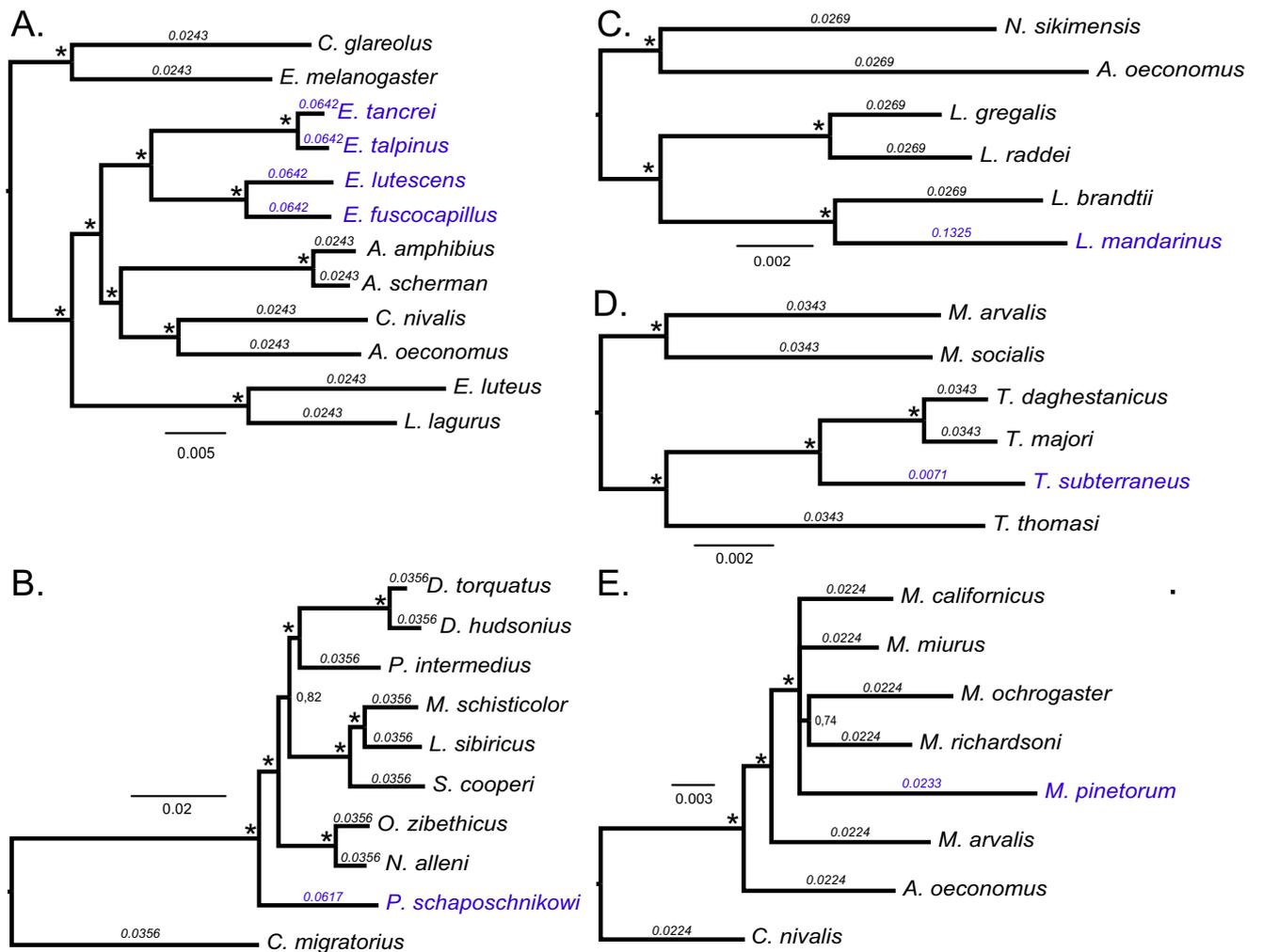


Рисунок 4. Филогенетические деревья, использованные для оценки отбора по отдельным ветвям. Числа - проанализированные значения ω . Подземные виды обозначены синим цветом. Звездочки (*) обозначают апостериорные байесовские вероятности 0,95-1,0.

значительно более высокими значениями несинонимичных замен в *cytB* подземных видов: 4, 237 и 241. Кроме того, одна позиция имеет высокое значение синонимичной замены: 236. Сравнение распределение замен по целым доменам (таблица 5, рис. 5) мы обнаружили значительные различия в мембранных доменах 1, 2, 5 и 9 и трансмембранных доменах 5 и 7 для несинонимичных замен (рис. 5a); и мембранный домен 6 и трансмембранный домен 5 для синонимичных замен (рис. 5b).

Таблица 4. Сайты в гене *cytB* с достоверной разницей в частоте замен между подземными и наземными видами. NS - несинонимичные замены, S - синонимичные замены, Fs - точный критерий Фишера, Holm - значения p-value после поправки Холма-Бонферрони на множественные значения.

Тип замен	Позиция	Подземные	Наземные	Fs	Holm
NS	4	0,875	0,1296	0,000049	0,023
NS	237	0,75	0,07	0,000084	0,038
NS	241	0,75	0,07	0,000084	0,039
S	236	1	0,148	0,0000038	0,002

Таблица 5. Домены в гене *cytB* с достоверной разницей в частоте замен между подземными и наземными видами. NS - несинонимичные замены, S - синонимичные замены, Fs - точный критерий Фишера, Holm - значения p после поправки Холма-Бонферрони на множественное тестирование, Memb - мембранный домен, ТМ - трансмембранный домен.

Домены	Подземные	Наземные	Тип замен	Fs	Holm
Memb1	0,45	0,097	NS	0,00000033	0,000011
Memb2	0,33	0,043	NS	0,00001176	0,000365
Memb5	0,263	0,047	NS	0,00033176	0,008957
Memb9	0,52	0,15	NS	0,00005434	0,001522
ТМ5	0,64	0,10	NS	0,00000001	0,000000
ТМ7	0,29	0,06	NS	0,00004166	0,001208
Memb6	0,40	0,19	S	0,00000012	0,000004
ТМ5	0,42	0,19	S	0,00002733	0,000820

3.2. Анализ адаптивной изменчивости митохондриальных геномов

Первой задачей при анализе митогеномов стала их сборка из сырых коротких прочтений, которые являются итоговыми продуктами секвенаторов нового поколения. Всего в группе молекулярной систематики ЗИН РАН было собрано 34 новых митохондриальных геномов представителей Arvicolinae.

Собранные митогеномы представляют собой кольцевые двухцепочечные последовательности ДНК. Состав и порядок генов соответствует структуре митохондриального генома других млекопитающих: 13 белок-кодирующих генов, 22 транспортные РНК (тРНК), две рибосомными РНК (рРНК), и некодирующая регуляторная область (D-петля). Девять генов (*ND6* и 8 тРНК) были ориентированы в обратном (reverse) направлении, тогда как остальные транскрибировались в прямом направлении.

Для дальнейшего анализа мы взяли следующие наборы таксонов (отмечены черным на рисунке 5), чьи полные митохондриальные геномы были доступны для анализа. Наземные виды: *Ondatra zibethicus* Linnaeus, 1766; *Dicrostonyx torquatus* Pallas, 1778; *Myopus schisticolor* Lilljeborg, 1844; *Lemmus sibiricus* Kerr, 1792; *Alticola tuvinicus* Ognev, 1950; *Alticola strelzovi* Kastsch, 1899; *Craseomys rufocanus* Sundevall, 1846; *Craseomys regulus* Thomas, 1906; *Clethrionomys glareolus* Schreber, 1780; *Lasiopodomys brandtii* Radde, 1861; *Lasiopodomys gregalis* Pallas, 1779; *Alexandromys fortis* Büchner, 1889; *Chionomys nivalis* Martins, 1842; *Chionomys gud* Satunin, 1909; *Lagurus lagurus* Pallas, 1773; *Eolagurus luteus* Eversmann, 1840; *Microtus californicus* Peale, 1848; *Microtus longicaudus* Merriam, 1888; *Microtus arvalis* Pallas, 1778; *Microtus socialis* Pallas, 1773; *Terricola daghestanicus* Shidlovsky, 1919.

Подземные виды: *Prometheomys shchaposhnikowi*, *Lasiopodomys mandarinus*, *Ellobius* (4 вида), *Terriocola subterraneus*, *Hyperacrius fertilis* True, 1894.

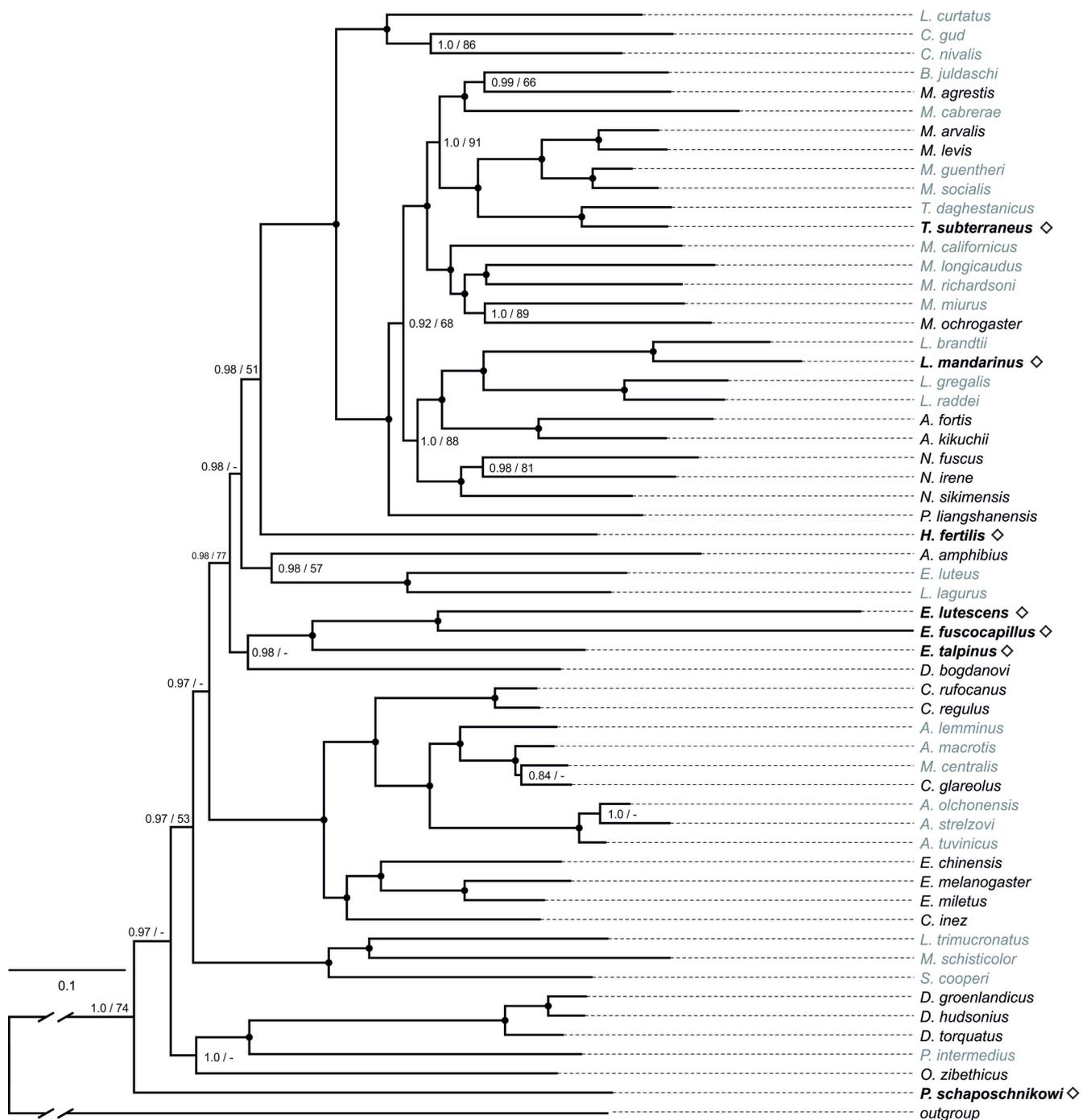


Рисунок 5. Филогенетическое дерево, построенное по последовательности 13 белок-кодирующих генов. Виды, взятые в дальнейший анализ, отмечены черным. Ромбиком обозначены подземные виды.

Для начала мы сравнили митохондриальные геномы по GC-обогащенности и смещению GC-состава (GC-skew). Результаты сравнения средних значений % GC и GC-skew показали сходную тенденцию: увеличение среднего значения % GC и уменьшения GC-skew. При этом разница незначительная, но общая тенденция наблюдается у всех подземных грызунов (рис. 6).

Для оценки количества замен в митохондриальных геномах использовали программу ProtParCon. Принцип ее работы не отличается от использованного ранее TreeSAAP. Если под-

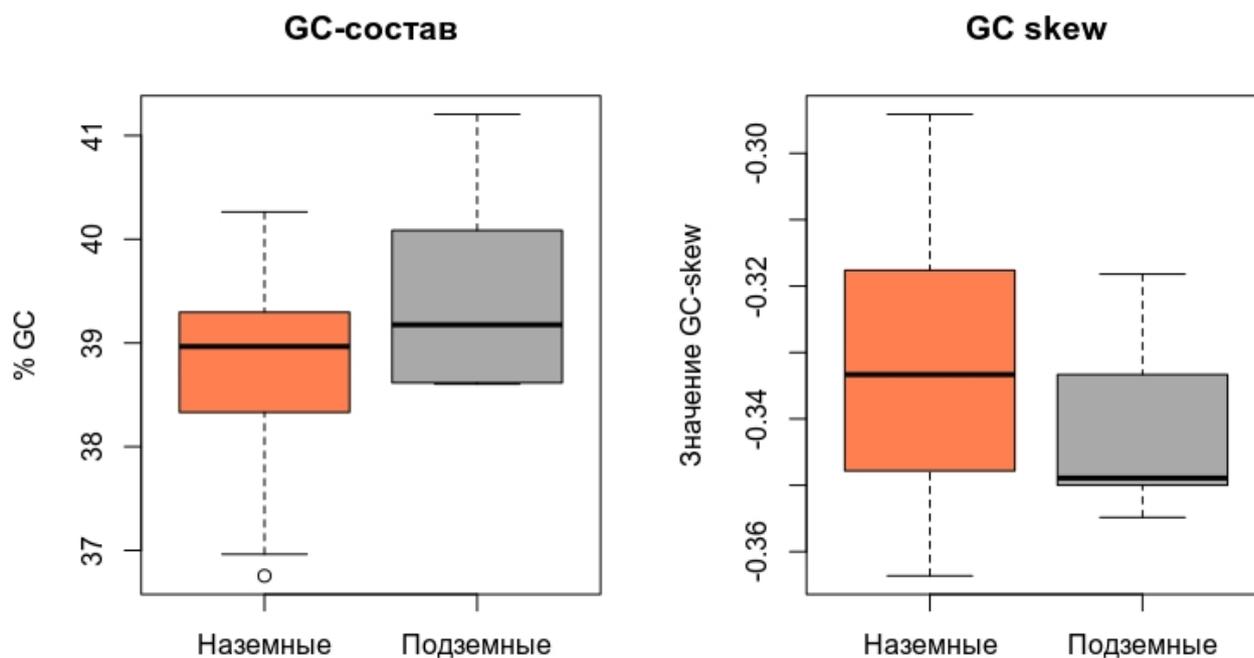


Рисунок 6. Сравнение % GC и GC-skew у подземных и наземных видов

считать в целом количество несинонимичных замен, нормировав их на количество взятых в анализ видах, то мы увидим следующую картину: доля несинонимичных замен в митохондриальных геномах подземных грызунов гораздо выше, чем у наземных. При этом разница достоверная и различается почти в два раза (рис. 7).

Если посмотреть распределение по белок-кодирующим генам в отдельности, то ситуация повторится — в каждом гене доля замен достоверно выше у подземных грызунов, чем у наземных (рис. 8).

Количество замен в митохондриальном геноме

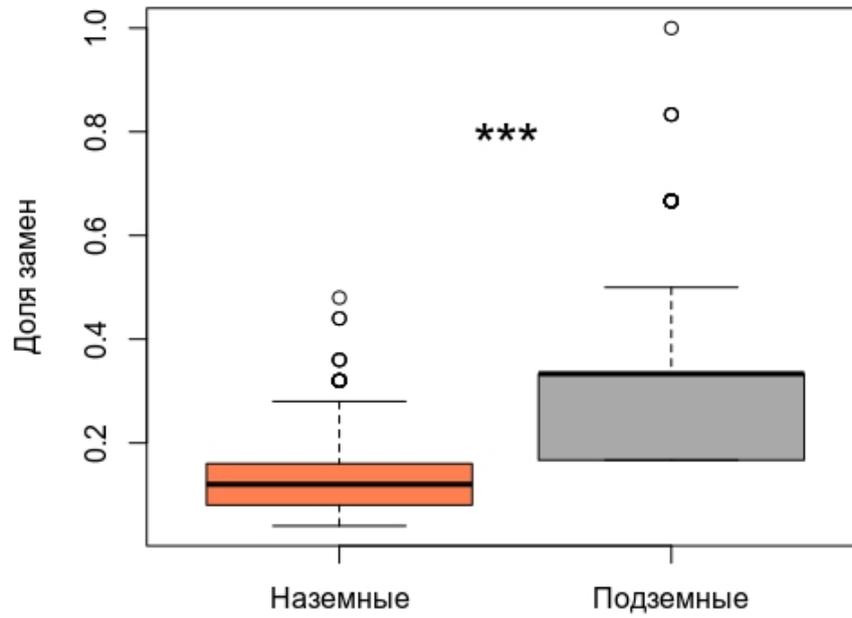


Рисунок 7. Соотношение несинонимичных замен у наземных и подземных видов

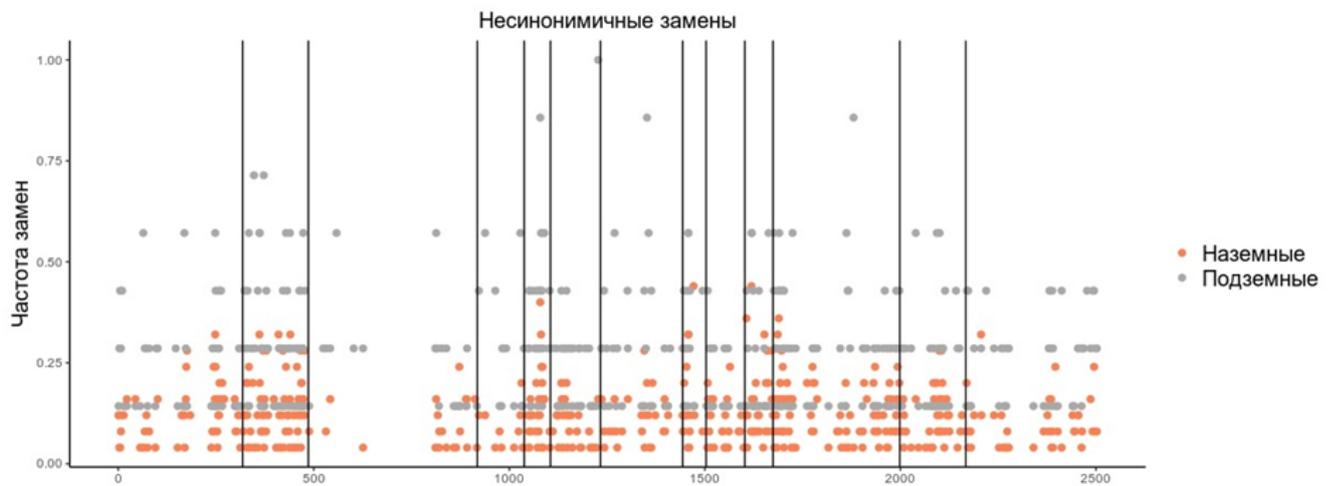


Рисунок 8. Распределение несинонимичных замен по белок-кодирующим генам

В дальнейшем анализе мы, по аналогии с логикой исследования гена *cytB*, искали характерные только для подземных грызунов замены. При анализе белок-кодирующих митохондриальных генов были выявлены параллельные замены в генах *COX1*, *COX3*, *ND5*, *ND6* и *cytB* (таблица 6). Больше всего замен было обнаружено в гене *cytB*.

Таблица 6. Обнаруженные замены, характерные для подземных грызунов. Ак – аминокислота

Ген	Позиция, ак	Изначальная ак	Замененная ак
<i>COX1</i>	73	М	I
<i>COX3</i>	121	I	V
<i>ND5</i>	466	F	L
<i>ND6</i>	466	A	V
<i>cytB</i>	56	T	S
<i>cytB</i>	338	I	V
<i>cytB</i>	357	A	T

Для почти всех замен в базах данных не обнаружено никакой информации о патогенности. Замена же 338 в *cytB* по базе данных ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/143898/>) может привести к одному из вариантов рака (рак груди) и синдрому Лея.

Потенциальное изменение фосфорелирования оказалось возможным только в сайте 56 гена *cytB*. Однако, все проанализированные нами сервера указывают на наличие фосфорелирования в обоих случаях: как с T у наземных, так и с S у подземных грызунов.

Как видно из анализов, результаты, полученные нами при исследовании адаптации гена *cytB* полностью повторяются при анализе белок-кодирующих генов всех митохондриальных геномов. Это может говорить о вовлеченности целого митогенома в адаптивный процесс.

Оценка GC-состава показывает разницу и повышение количества этих нуклеотидов у подземных грызунов. Уровень смещения (GC-skew) у подземных грызунов по отдельному *cytB* и по митохондриальным геномам меньше, чем у наземных грызунов. Несмотря на то, что разница в обоих случаях недостоверна, это может указывать на адаптивные следы.

Смещение в сторону повышенного содержания A/T наблюдается в мтДНК многих видов [101]. Это может быть вызвано факторами, влияющими на скорость повреждения ДНК [102] и относительную доступность каждого нуклеотида в клеточной среде митохондрии [103]. AT-богатые геномы могут реплицироваться быстрее, чем GC-богатые и, при прочих равных, обладают избирательным преимуществом в гетероплазматической популяции [104]. Поскольку у подземных грызунов снижен общий метаболический уровень, может также снижаться и скорость репликации митогеномов, что и может повлечь обогащение GC-нуклеотидами и, помимо этого, обеспечить большую устойчивость перед активными формами кислорода.

Впервые показанное Andrews [105] и в последующем повторенный целым рядом исследователей [49,50,55,106], ряд работ свидетельствовал в пользу наличия признаков положи-

тельного отбора в эволюции гена *cytB*. Последующие исследования показали, что, несмотря на сильные функциональные ограничения, мтДНК может подвергаться положительному направленному отбору, например, в случаях, когда требуется энергоемкий образ жизни и/или ограниченная доступность кислорода [57,61,107].

В свою очередь, Нево [4] коррелировал вариацию последовательности части гена *cytB* с экологическими различиями между хромосомными расами слепых землекопов *Spalax ehrenbergi*. На сегодняшний день влияние этих изменений на респираторную функцию остается неясным. Da Silva с коллегами [50] обнаружили достоверно более высокое отношение dN/dS (ω) — отношение несинонимичных к синонимичным заменам — в независимых линиях подземных грызунов по сравнению с их наземными сестринскими видами. Это предполагает связь между эволюцией гена *cytB* (и может быть характерно и для всех остальных митохондриальных генов) и колонизация гипоксической среды. Позднее это наблюдение было подтверждено [57] с использованием набора из семи полных митохондриальных геномов Octodontidae.

Мы исследовали частоты замен как по гену в целом, так и по доменам у подземных и наземных грызунов. В случае анализа отдельно *cytB* мы также провели этот анализ по всем сайтам гена. В обоих случаях достоверные различия в частотах наблюдались чаще при несинонимичных заменах, чем при синонимичных. Во всех генах уровень несинонимичных замен достоверно выше у подземных грызунов, чем у наземных. Это повторяется при подсчете соотношения несинонимичных и синонимичных замен для гена *cytB* и анализе белок-кодирующих генов митохондриального генома.

Найденные замены в митохондриальных генах потенциально могут влиять на биохимическую структуру комплекса. Однако, это требует дальнейшего моделирования.

4. Выводы

1. При анализе гена *cytB* были обнаружены три замены, которые есть у филогенетически независимых подземных линий грызунов.
2. Анализ третичной структуры этих замен показал, что потенциально они могут приводить к изменению структуры белка.
3. Достоверные различия в соотношении несинонимичных и синонимичных замен (ω) в гене цитохрома B были показаны для видов рода *Ellobius*, *Lasiopodomys mandarinus* и *Terricola subterraneus*.
4. Как при анализе отдельно гена *cytB*, так и полных митохондриальных геномов показано, что частота несинонимичных замен достоверно выше у подземных грызунов по сравнению с наземными.
5. При анализе белок-кодирующих митохондриальных генов были выявлены параллельные замены у подземных грызунов в генах *COX1*, *COX3*, *ND5*, *ND6* и *cytB*.

5. Заключение

Проведенная нами работа говорит об ослаблении отбора на митохондриальные гены подземных грызунов. Это показано и с помощью оценки уровня отбора разными методами и отдельным подсчетом частоты несинонимичных замен по сайтам и последующим сравнением с частотой замен у наземных грызунов. Также в белок-кодирующих митохондриальных генах были обнаружены сайты с параллельными аминокислотными заменами у филогенетически неродственных подземных грызунов.

Список использованной литературы

1. Brodsky L.I. et al. Evolutionary regulation of the blind subterranean mole rat, *Spalax*, revealed by genome-wide gene expression // Proc. Natl. Acad. Sci. 2005. Vol. 102, N 47. P. 17047-17052.
2. Fang X. Convergent and divergent adaptations of subterranean rodents // PhD thesis. 2015.
3. Nevo E., Reig O. Evolution of subterranean mammals at the organismal and molecular levels // Proc. fifth Int. Theriol. Congr. held Rome, Italy,. 1990.
4. Nevo E. Mosaic evolution of subterranean mammals: regression, progression, and global convergence. // Oxford Univ. Press. 1999.
5. Lacey E., Patton J., Cameron G.N. Life underground: The biology of subterranean rodents. The University of Chicago Press, Chicago, Illinois, 2000. 449 p.
6. Begall S., Burda H., Schleich C.E. Subterranean Rodents: News from Underground // Subterranean Rodents. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2007. P. 3-9.
7. Robert A. Martin. Biochronology of Latest Miocene Through Pleistocene Arvicolid Rodents from the Central Great Plains of North America // Coloquios Paleontol. 2003. Vol. 1. P. 373-383.
8. Fejfar O. et al. Microtoid cricetids and the Early history of arvicolids (Mammalia, Rodentia) // Palaeontol. Electron. 2011. Vol. 14, N 3. P. 12.
9. Balakirev A.E., Abramov A.V., Rozhnov V.V. Taxonomic revision of *Niviventer* (Rodentia, Muridae) from Vietnam: a morphological and molecular approach // Russ. J. Theriol. 2012. Vol. 10, N 1. P. 1-26.
10. Gomes Rodrigues H., Marivaux L., Vianey-Liaud M. The Cricetidae (Rodentia, Mammalia) from the Ulanatal area (Inner Mongolia, China): New data concerning the evolution of Asian cricetids during the Oligocene // J. Asian Earth Sci. 2012. Vol. 56. P. 160-179.
11. Abramson N.I. et al. Supraspecies relationships in the subfamily Arvicolinae (Rodentia, Cricetidae): An unexpected result of nuclear gene analysis // Mol. Biol. 2009. Vol. 43, N 5. P. 834-846.
12. Lychev G.F., Savinov P.F. Late Pliocene lagomorphs and rodents of Kiikbay // Mater. Hist. fauna flora Kazakhstan, Almaty. 1974. Vol. 6. P. 39-57.
13. Lebedev V. et al. Cryptic variation in mole voles *Ellobius* (Arvicolinae, Rodentia) of Mongolia // Zool. Scr. 2020. Vol. 49, N 5. P. 535-548.
14. Martínková N., Moravec J. Multilocus phylogeny of arvicoline voles (Arvicolini, Rodentia) shows small tree terrace size // Folia Zool. 2012. Vol. 61, N 3-4. P. 254-267.

15. Martin R.A. et al. Rodent community change at the Pliocene-Pleistocene transition in southwestern Kansas and identification of the *Microtus* immigration event on the Central Great Plains // Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol. 2008. Vol. 267, N 3-4. P. 196-207.
16. McNab B.K. The Metabolism of Fossorial Rodents: A Study of Convergence // Ecology. 1966. Vol. 47, N 5. P. 712-733.
17. White C.R. The Influence of Foraging Mode and Arid Adaptation on the Basal Metabolic Rates of Burrowing Mammals // Physiol. Biochem. Zool. 2003. Vol. 76, N 1. P. 122-134.
18. Vleck D. The Energy Cost of Burrowing by the Pocket Gopher *Thomomys bottae* // Physiol. Zool. 1979. Vol. 52, N 2. P. 122-136.
19. Gorecki A., Christov L. Metabolic rate of the lesser mole rat // Acta Theriol. (Warsz). 1969.
20. Wei D.B. et al. Blood-gas properties of plateau zokor (*Myospalax baileyi*) // Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol. 2006. Vol. 145, N 3. P. 372-375.
21. Avivi A. et al. Adaptive hypoxic tolerance in the subterranean mole rat *Spalax ehrenbergi*: the role of vascular endothelial growth factor // FEBS Lett. 1999. Vol. 452, N 3. P. 133-140.
22. Shams I., Nevo E., Avivi A. Ontogenetic expression of erythropoietin and hypoxia-inducible factor-1 alpha genes in subterranean blind mole rats // FASEB J. 2005. Vol. 19, N 2. P. 1-14.
23. Shams I., Avivi A., Nevo E. Oxygen and carbon dioxide fluctuations in burrows of subterranean blind mole rats indicate tolerance to hypoxic-hypercapnic stresses // Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol. 2005. Vol. 142, N 3. P. 376-382.
24. Widmer H.R. et al. Working underground: Respiratory adaptations in the blind mole rat // Proc. Natl. Acad. Sci. 1997. Vol. 94, N 5. P. 2062-2067.
25. KLEINSCHMIDT T., NEVO E., BRAUNITZER G. The Primary Structure of the Hemoglobin of the Mole Rat (*Spalax ehrenbergi*, Rodentia, Chromosome Species 60) // Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiol. Chemie. 1984. Vol. 365, N 1. P. 531-538.
26. Arieli R. The atmospheric environment of the fossorial mole rat (*Spalax ehrenbergi*): Effects of season, soil texture, rain, temperature and activity // Comp. Biochem. Physiol. - Part A Physiol. 1979. Vol. 63, N 4. P. 569-575.
27. Gurnett A.M. et al. The myoglobin of rodents: *Lagostomus maximus* (viscacha) and *Spalax ehrenbergi* (mole rat) // J. Protein Chem. 1984. Vol. 3, N 5-6. P. 445-454.
28. McNab B.K. The Influence of Body Size on the Energetics and Distribution of Fossorial and Burrowing Mammals // Ecology. 1979. Vol. 60, N 5. P. 1010-1021.
29. McNab B.K. Food Habits, Energetics, and the Population Biology of Mammals // Am. Nat. 1980. Vol. 116, N 1. P. 106-124.
30. REICHMAN O.J., SMITH S.C. Burrows and burrowing behavior by mammals // Curr. Mammal. 1990. N 2. P. 197-244.
31. Darwin C. The expression of the emotions in man and animals // London. 1872.

32. Cooper H.M., Herbin M., Nevo E. Ocular regression conceals adaptive progression of the visual system in a blind subterranean mammal // *Nature*. 1993. Vol. 361, N 6408. P. 156-159.
33. Wright S. Pleiotropy in the Evolution of Structural Reduction and of Dominance // *Am. Nat.* 1964. Vol. 98, N 899. P. 65-69.
34. Wilkens H. Genetic Interpretation of Regressive Evolutionary Processes: Studies on Hybrid Eyes of Two *Astyanax* Cave Populations (Characidae, Pisces) // *Evolution* (N. Y). 1971. Vol. 25, N 3. P. 530.
35. Burda H., Bruns V., Müller M. Sensory adaptations in subterranean mammals. // *Prog Clin Biol Res.* 1990. N 335. P. 269-293.
36. Borghi C.E., Giannoni S.M., Roig V.G. Eye Reduction in Subterranean Mammals and Eye Protective Behavior in *C Tenomys* // *Mastozoología Neotrop.* 2002. Vol. 9, N 2. P. 123-134.
37. ARMSTRONG J., QUILLIAM T.A. Nerve Endings in the Mole's Snout // *Nature*. 1961. Vol. 191, N 4796. P. 1379-1380.
38. Heth G. et al. Vibrational communication in subterranean mole rats (*Spalax ehrenbergi*) // *Behav. Ecol. Sociobiol.* 1987. Vol. 21, N 1. P. 31-33.
39. Kimchi T., Etienne A.S., Terkel J. A subterranean mammal uses the magnetic compass for path integration // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2004. Vol. 101, N 4. P. 1105-1109.
40. Lin G. et al. Adaptive evolution of flaky thumb claw and elongated compulsory arousal duration in the subterranean rodent plateau zokor // *Ethol. Ecol. Evol.* 2011. Vol. 23, N 1. P. 77-80.
41. Nevo E. Adaptive Convergence and Divergence of Subterranean Mammals // *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 1979. Vol. 10, N 1. P. 269-308.
42. Hildebrand M. Digging in quadrupeds. Cambridge, United Kingdom.: Belknap Press, Cambridge, United Kingdom., 1985.
43. Burda H. et al. How to eat a carrot? Convergence in the feeding behavior of subterranean rodents // *Naturwissenschaften.* 1999. Vol. 86, N 7. P. 325-327.
44. Lehmann W.H. The forelimb architecture of some fossorial rodents // *J. Morphol.* 1963. Vol. 113, N 1. P. 59-76.
45. Yalden D.W. The anatomy of mole locomotion // *J. Zool.* 2009. Vol. 149, N 1. P. 55-64.
46. Puttick G.M., Jarvis J.U.M. The functional anatomy of the neck and forelimbs of the Cape golden mole, *Chrysochloris asiatica* (Lipotyphla: Chrysochloridae) // *African Zool.* 1977. Vol. 12, N 2.
47. Andersen D.C. Belowground Herbivory: The Adaptive Geometry of Geomyid Burrows // *Am. Nat.* 1982. Vol. 119, N 1. P. 18-28.
48. Tucker R. The digging behavior and skin differentiations in *Heterocephalus glaber* // *J. Morphol.* 1981. Vol. 168, N 1. P. 51-71.

49. Tomasco I.H., Lessa E.P. Two mitochondrial genes under episodic positive selection in subterranean octodontoid rodents // Gene. Elsevier B.V., 2014. Vol. 534, N 2. P. 371-378.
50. Da Silva C.C. et al. Genes and Ecology: Accelerated Rates of Replacement Substitutions in the Cytochrome b Gene of Subterranean Rodents // Open Evol. J. 2009. N 3. P. 17-30.
51. Zhang T. et al. Cytochrome b gene selection of subterranean rodent Gansu zokor *Eospalax cansus* (Rodentia, Spalacidae) // Zool. Anz. Elsevier GmbH., 2013. Vol. 252, N 1. P. 118-122.
52. Li D.H. Economic Animal Fauna of Qinghai. // Qinghai People's Publ. House., 1989. P. 681-682.
53. McClellan D.A. et al. Physicochemical evolution and molecular adaptation of the cetacean and artiodactyl cytochrome b proteins // Mol. Biol. Evol. 2005. Vol. 22, N 3. P. 437-455.
54. Adkins R.M., Honeycutt R.L. Evolution of the primate cytochrome c oxidase subunit II gene // J. Mol. Evol. 1994. Vol. 38, N 3. P. 215-231.
55. Di Rocco F. et al. Rapid evolution of cytochrome c oxidase subunit II in camelids (Tylopoda, Camelidae) // J. Bioenerg. Biomembr. 2006. Vol. 38, N 5-6. P. 293-297.
56. Dirmeier R. et al. Exposure of Yeast Cells to Anoxia Induces Transient Oxidative Stress // J. Biol. Chem. 2002. Vol. 277, N 38. P. 34773-34784.
57. Tomasco I.H., Lessa E.P. The evolution of mitochondrial genomes in subterranean caviomorph rodents: Adaptation against a background of purifying selection // Mol. Phylogenet. Evol. 2011. Vol. 61, N 1. P. 64-70.
58. Luo Y. et al. Mitochondrial genome analysis of *Ochotona curzoniae* and implication of cytochrome c oxidase in hypoxic adaptation // Mitochondrion. 2008. Vol. 8, N 5-6. P. 352-357.
59. THOMAS, STEVEN P. SUTHERS R.A. The Physiology and Energetics of Bat Flight // J. Exp. Biol. 1972. N 57. P. 317-335.
60. Maina J.N. What it takes to fly: the structural and functional respiratory refinements in birds and bats // J. Exp. Biol. 2000. Vol. 203, N 20. P. 3045 LP - 3064.
61. Shen Y.Y. et al. Adaptive evolution of energy metabolism genes and the origin of flight in bats // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2010. Vol. 107, N 19. P. 8666-8671.
62. Schizas N. V. et al. Differential Survival of Three Mitochondrial Lineages of a Marine Benthic Copepod Exposed to a Pesticide Mixture // Environ. Sci. Technol. 2001. Vol. 35, N 3. P. 535-538.
63. Takeda K. et al. Replicative Advantage and Tissue-Specific Segregation of RR Mitochondrial DNA Between C57BL/6 and RR Heteroplasmic Mice // Genetics. 2000. Vol. 155, N 2. P. 777 LP - 783.
64. Nigro L. Nuclear background affects frequency dynamics of mitochondrial DNA variants in *Drosophila simulans* // Heredity (Edinb). 1994. Vol. 72, N 6. P. 582-586.

65. Hutter C.M., Rand D.M. Competition between mitochondrial haplotypes in distinct nuclear genetic environments: *Drosophila pseudoobscura* vs. *D. persimilis*. // *Genetics*. 1995. Vol. 140, N 2. P. 537 LP - 548.
66. Kilpatrick S.T., Rand D.M. Conditional hitchhiking of mitochondrial DNA: frequency shifts of *Drosophila melanogaster* mtDNA variants depend on nuclear genetic background. // *Genetics*. 1995. Vol. 141, N 3. P. 1113 LP - 1124.
67. Stordeur E. de. Nonrandom partition of mitochondria in heteroplasmic *Drosophila* // *Heredity* (Edinb). 1997. Vol. 79, N 6. P. 615-623.
68. Rand D.M., Clark A.G., Kann L.M. Sexually Antagonistic Cytonuclear Fitness Interactions in *Drosophila melanogaster* // *Genetics*. 2001. Vol. 159, N 1. P. 173 LP - 187.
69. James A.C., Ballard J.W.O. Mitochondrial Genotype Affects Fitness in *Drosophila simulans* // *Genetics*. 2003. Vol. 164, N 1. P. 187 LP - 194.
70. Miller D.N. et al. Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples // *Appl. Environ. Microbiol.* 1999. Vol. 65, N 11. P. 4715-4724.
71. Lebedev V.S. et al. Molecular phylogeny of the genus *Alticola* (Cricetidae, Rodentia) as inferred from the sequence of the cytochrome b gene // *Zool. Scr.* 2007. Vol. 36, N 6. P. 547-563.
72. Ohdachi S. et al. Intraspecific phylogeny and geographical variation of six species of northeastern Asiatic *Sorex* shrews based on the mitochondrial cytochrome b sequences // *Mol. Ecol.* 2001. Vol. 10, N 9. P. 2199-2213.
73. Bannikova A.A. et al. Genetic diversity of *Chionomys* genus (Mammalia, Arvicolinae) and comparative phylogeography of snow voles // *Russ. J. Genet.* 2013. Vol. 49, N 5. P. 561-575.
74. Petrova T. V. et al. Cryptic speciation in the narrow-headed vole *Lasiopodomys (Stenocranius) gregalis* (Rodentia: Cricetidae) // *Zool. Scr.* 2016. Vol. 45, N 6. P. 618-629.
75. Poux C. et al. Arrival and Diversification of Caviomorph Rodents and Platyrrhine Primates in South America // *Syst. Biol.* / ed. Soltis P. 2006. Vol. 55, N 2. P. 228-244.
76. DeBry R.W., Seshadri S. Nuclear intron sequences for phylogenetics of closely related mammals: an example using the phylogeny of mus // *J. Mammal.* 2001. Vol. 82, N 2. P. 280-288.
77. Andrews S. FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data [Online]. // Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>. 2010.
78. Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data // *Bioinformatics*. 2014. Vol. 30, N 15. P. 2114-2120.
79. Bankevich A. et al. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing // *J. Comput. Biol.* 2012. Vol. 19, N 5. P. 455-477.

80. Bernt M. et al. MITOS: Improved de novo metazoan mitochondrial genome annotation // *Mol. Phylogenet. Evol.* 2013. Vol. 69, N 2. P. 313-319.
81. Darling A.C.E. Mauve: Multiple Alignment of Conserved Genomic Sequence With Rearrangements // *Genome Res.* 2004. Vol. 14, N 7. P. 1394-1403.
82. Katoh K., Standley D.M. MAFFT: Iterative Refinement and Additional Methods. 2014. P. 131-146.
83. Arabi J. et al. Studying sources of incongruence in arthropod molecular phylogenies: Sea spiders (Pycnogonida) as a case study // *C. R. Biol.* 2010. Vol. 333, N 5. P. 438-453.
84. Hassanin A., Léger N., Deutsch J. Evidence for Multiple Reversals of Asymmetric Mutational Constraints during the Evolution of the Mitochondrial Genome of Metazoa, and Consequences for Phylogenetic Inferences // *Syst. Biol.* / ed. Collins T. 2005. Vol. 54, N 2. P. 277-298.
85. Cock P.J.A. et al. Biopython: freely available Python tools for computational molecular biology and bioinformatics // *Bioinformatics.* 2009. Vol. 25, N 11. P. 1422-1423.
86. Jobb G., Von Haeseler A., Strimmer K. TREEFINDER: A powerful graphical analysis environment for molecular phylogenetics // *BMC Evol. Biol.* 2004. Vol. 4. P. 1-9.
87. Ronquist F. et al. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space // *Syst. Biol.* 2012. Vol. 61, N 3. P. 539-542.
88. Rambaut A., Drummond A.J., Suchard M. Tracer v1. 6. Available from <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>. 2014.
89. Woolley S. et al. TreeSAAP: Selection on Amino Acid Properties using phylogenetic trees // *Bioinformatics.* 2003. Vol. 19, N 5. P. 671-672.
90. McClellan D.A., McCracken K.G. Estimating the Influence of Selection on the Variable Amino Acid Sites of the Cytochrome b Protein Functional Domains // *Mol. Biol. Evol.* 2001. Vol. 18, N 6. P. 917-925.
91. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. 2017.
92. Yang Z. PAML 4: Phylogenetic Analysis by Maximum Likelihood // *Mol. Biol. Evol.* 2007. Vol. 24, N 8. P. 1586-1591.
93. Nielsen R., Yang Z. Likelihood models for detecting positively selected amino acid sites and applications to the HIV-1 envelope gene // *Genetics.* 1998. Vol. 148, N 3. P. 929-936.
94. Crowley P.J. et al. The role of molecular modeling in the design of analogues of the fungicidal natural products crocacins A and D // *Bioorg. Med. Chem.* 2008. Vol. 16, N 24. P. 10345-10355.
95. Hunte C. et al. Structure at 2.3 Å resolution of the cytochrome *bc1* complex from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* co-crystallized with an antibody Fv fragment // *Structure.* 2000. Vol. 8, N 6. P. 669-684.
96. Gao X. et al. Structural Basis for the Quinone Reduction in the bc 1 Complex: A Comparative Analysis of Crystal Structures of Mitochondrial Cytochrome bc 1 with

- Bound Substrate and Inhibitors at the Q i Site † , ‡ // Biochemistry. 2003. Vol. 42, N 30. P. 9067-9080.
97. Webb B., Sali A. Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER // Curr. Protoc. Bioinforma. 2016. Vol. 54, N 1.
 98. Lomize M.A. et al. OPM database and PPM web server: resources for positioning of proteins in membranes // Nucleic Acids Res. 2012. Vol. 40, N D1. P. D370-D376.
 99. Blom N. et al. Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence // Proteomics. 2004. Vol. 4, N 6. P. 1633-1649.
 100. Xue Y. et al. GPS 2.1: enhanced prediction of kinase-specific phosphorylation sites with an algorithm of motif length selection // Protein Eng. Des. Sel. 2011. Vol. 24, N 3. P. 255-260.
 101. Ballard J.W.O., Whitlock M.C. The incomplete natural history of mitochondria // Mol. Ecol. 2004. Vol. 13, N 4. P. 729-744.
 102. Martin A.P. Metabolic rate and directional nucleotide substitution in animal mitochondrial DNA. // Mol. Biol. Evol. 1995.
 103. Xia X., Hafner M.S., Sudman P.D. On Transition Bias in Mitochondrial Genes of Pocket Gophers // J. Mol. Evol. 1996. Vol. 43. P. 32-40.
 104. Ballard J.W.O. Comparative Genomics of Mitochondrial DNA in Members of the *Drosophila melanogaster* Subgroup // J. Mol. Evol. 2000. Vol. 51, N 1. P. 48-63.
 105. Andrews T.D., Jermini L.S., Easton S. Accelerated Evolution of Cytochrome b in Simian Primates: Adaptive Evolution in Concert with Other Mitochondrial Proteins? // J. Mol. Evol. 1998. Vol. 47, N 3. P. 249-257.
 106. Shao Y. et al. Genetic adaptations of the plateau zokor in high-elevation burrows // Sci. Rep. Nature Publishing Group, 2015. Vol. 5. P. 1-11.
 107. Blier P.U., Dufresne F., Burton R.S. Natural selection and the evolution of mtDNA-encoded peptides: Evidence for intergenomic co-adaptation // Trends Genet. 2001. Vol. 17, N 7. P. 400-406.