

УДК 575.174:599.742.4

МОЛЕКУЛЯРНОЕ ДАТИРОВАНИЕ ВНУТРИВИДОВОЙ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ГОРНОСТАЯ (*MUSTELA ERMINEA*) ПО ДАННЫМ ОБ ИЗМЕНЧИВОСТИ ГЕНА *ND2* МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНОМА

© 2014 г. **Б.А. Малярчук, Г.А. Денисова, М.В. Деренко**Институт биологических проблем Севера Дальневосточного отделения
Российской академии наук, Магадан, Россия,
e-mail: malyarchuk@ibpn.ru

Поступила в редакцию 17 июля 2014 г. Принята к публикации 29 июля 2014 г.

Определены нуклеотидные последовательности гена второй субъединицы NADH-дегидрогеназы (*ND2*) митохондриальной ДНК (мтДНК) горностая (*Mustela erminea*) из популяции северо-восточной части Камчатки. Анализ полученных в настоящей работе и опубликованных ранее данных об изменчивости гена *ND2* горностая показал, что уровень дивергенции между американскими и евразийскими гаплотипами мтДНК составляет по этому гену примерно 5 %, а между евразийскими гаплотипами – всего 0,5 %. Результаты филогенетического анализа также свидетельствуют о высокодостоверном разделении американских и евразийских линий мтДНК горностая, а внутри евразийской клады мтДНК с высокой статистической поддержкой выделяется кластер камчатских гаплотипов. Результаты молекулярного датирования показали, что разделение предковой популяции горностая произошло 1,3–1,6 млн лет назад, а дивергенция евразийских линий мтДНК – примерно 300 тыс. лет назад. Эволюционный возраст гаплотипов мтДНК горностая из исследованного нами района Камчатки составил примерно 95–120 тыс. лет, что совершенно не соответствует представлениям других авторов о реколонизации Евразии горностаем лишь после периода последнего ледникового максимума (19–26,5 тыс. лет назад). Обсуждаются причины выявленного несоответствия.

Ключевые слова: горностаи, митохондриальная ДНК, ген *ND2*, филогенетический анализ, молекулярное датирование.

ВВЕДЕНИЕ

Горностаи (*Mustela erminea*) относятся к числу малоизученных в генетическом отношении видов животных, несмотря на его широкий ареал. Область распространения горностая охватывает большую часть Евразии и Северной Америки – от побережья Северного Ледовитого океана и до границ зоны субтропиков (King, 1983; Павлинов, 1999). Предполагается, что горностаи как вид сформировались в среднем плейстоцене в Европе и примерно 500 тыс. лет назад проник на американский континент (Kurten, Anderson, 1980; King, 1983).

В одном из первых исследований популяций горностая, проведенных с помощью маркеров митохондриальной ДНК (мтДНК) –

гена цитохрома *b*, были выявлены три клады мтДНК (Fleming, Cook, 2002). Две из них распространены в популяциях Северной Америки, а третья включала митохондриальные линии, обнаруженные как на Аляске, так и в Евразии. К сожалению, в данной работе были представлены только три образца из Евразии, молекулярное датирование изменчивости мтДНК не проводилось, хотя авторами было высказано предположение о влиянии повторявшихся ледниковых периодов на дифференциацию генофонда горностая в популяциях Северной Америки. В другой работе, N. Kurose с соавт. (2005), исследовали филогеографию популяций на всем ареале горностая с помощью анализа полиморфизма некодирующей *D*-области мтДНК, однако авторы работы пришли к выводу об очень

низком уровне генетического полиморфизма у горностая и не смогли прояснить пространственную структуру генофонда этого вида. Тем не менее, N. Kurose с соавт. (2005) предположили, что низкий уровень генетической дифференциации горностая свидетельствует о том, что вся территория Евразии была реколонизирована популяциями этого вида лишь в послеледниковое время, т. е. после периода максимального оледенения, имевшего место 19–26,5 тыс. лет назад (Clark *et al.*, 2009). О заселении горностаем Британских островов лишь в послеледниковое время свидетельствуют результаты работы N. Martinkova с соавт. (2007), полученные с помощью молекулярного датирования изменчивости участка мтДНК, включающего гены цитохрома *b*, тРНК(Thr), тРНК(Pro) и фрагмента D-области. В этой работе установлено, что эволюционный возраст популяций горностая в континентальной Европе составляет примерно 60 тыс. лет.

Кроме указанных выше работ, единичные образцы *M. erminea* были использованы в исследованиях в области молекулярной систематики куньих, а также цитогенетики (Графодатский и др., 1976; Лушникова и др., 1989; Koenfli, Wayne, 1998; Domingo-Roura *et al.*, 2005; Flynn *et al.*, 2005; Hosoda *et al.*, 2005; Koenfli *et al.*, 2008; Harding, Smith, 2009).

Таким образом, в связи с дефицитом данных об изменчивости мтДНК горностая и отсутствием молекулярных датировок внутривидовой дивергенции в настоящей работе исследован полиморфизм нуклеотидных последовательностей гена второй субъединицы НАДН-дегидрогеназы (*ND2*) в камчатской выборке горностая, проведен филогенетический анализ этого гена и с помощью различных подходов датирован процесс филогенетической дифференциации *M. erminea*. Следует отметить, что ген *ND2* ранее использовался как для изучения глобальной филогении хищных (Flynn *et al.*, 2005), так и для филогеографических исследований куньих (Sato *et al.*, 2009, 2011).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали образцы мышечной ткани 5 экземпляров горностая (*M. erminea*) из северо-восточной части Камчатки (Олоторский

район Камчатского края). Проанализированные образцы хранятся в коллекции биологических тканей животных в лаборатории генетики ИБПС ДВО РАН. Геномную ДНК выделяли с использованием стандартных методов, включающих лизис клеток протеиназой К (Sigma, USA) в присутствии 1% додецилсульфата натрия, очистку ДНК смесью фенола и хлороформа и осаждение ДНК этиловым спиртом.

Для анализа изменчивости мтДНК исследовали полный ген *ND2* (длиной 1044 пар нуклеотидов), амплифицированный с использованием праймеров *ND2-FelF* и *ND2-melExtR* и условий полимеразной цепной реакции, описанных ранее Sato с соавт. (2009). Секвенирование амплифицированного участка мтДНК проведено с использованием праймеров *ND2-FelF* и *ND2-CarF* (Sato *et al.*, 2009) и набора для циклического секвенирования ДНК Big Dye Terminator (Applied Biosystems, v. 3.1) на генетическом анализаторе ABI Prism 3130 (Applied Biosystems, США). Выравнивание и анализ нуклеотидных последовательностей проводили с помощью программ пакета MEGA 5.05 (Tamura *et al.*, 2011). Расчет дивергенции между нуклеотидными последовательностями гена *ND2* проводили, основываясь на значениях *p*-расстояния (число нуклеотидных различий на сайт), с помощью пакета MEGA 5.05.

В анализе использовали также все доступные из GenBank данные об изменчивости гена *ND2* у горностая: последовательности AB564145 (Новосибирск), AB564146 (о. Хонсю), AB564147 (Канада), по данным работы Hosoda с соавт. (2011) и AY750626 (США), по данным работы Flynn с соавт. (2005). Кроме мтДНК *M. erminea* для филогенетического анализа использовали в качестве внешних групп нуклеотидные последовательности следующих куньих: ласки (*Mustela nivalis*) AY750629 (Flynn *et al.*, 2005) и DQ533949 (Fulton, Strobeck, 2007), американской куницы (*Martes americana*) (AY598546; Delisle, Strobeck, 2005), лесной куницы (*Martes martes*) (AB564141; Hosoda *et al.*, 2011) и соболя (*Martes zibellina*) AB455741 (Sato *et al.*, 2009) и NC_011579 (Xu *et al.*, 2012). Множественные выравнивания нуклеотидных последовательностей проводили с помощью программы ClustalW пакета программ MEGA 5.05.

Выбор наиболее оптимальных моделей нуклеотидных замен проводили с помощью байесовского информационного критерия (BIC, **Bayesian Information Criterion**) пакета программ MEGA 5.05. Для филогенетического анализа применяли методы ближайшего соседа (NJ, neighbor joining) и максимального правдоподобия (ML, **maximum likelihood**), реализованные в пакете программ MEGA 5.05, и метод Байеса (BI, **Bayesian inference**), реализованный в пакете программ BEAST 1.7.5 (Drummond *et al.*, 2012).

Для байесовского анализа проводили по три независимых цикла, каждый длиной 60 млн поколений. Это обеспечило стабилизацию марковских цепей (MCMC, **Markov Chain Monte Carlo**), значения параметра ESS (**effective sample size**) для всех статистик были более 200. Для анализа данных, сгенерированных с помощью BEAST 1.7.5, использовали программу Tracer 1.4. Для визуализации филогенетических деревьев, сгенерированных с помощью программы TreeAnnotator 1.7.5, использовали программу FigTree 1.4.0. Значения байесовских апостериорных вероятностей (BPP, **Bayesian Posterior Probability**), равные 95 % и выше, считали высокодостоверными.

Молекулярное датирование проводили с помощью байесовского подхода, реализованного в пакете программ BEAST 1.7.5. Для выбора модели молекулярных часов с помощью программы Tracer 1.4 исследовали гистограммы стандартных отклонений (параметр **ucl.d.stdev**), полученные при использовании наиболее оптимальной модели нуклеотидных замен TN93+G+I, **нестрогих логнормальных молекулярных часов** и протяженности байесовского анализа, составляющей 60 млн поколений. Модель молекулярных часов выбирали также с помощью ML теста, реализованного в пакете программ MEGA 5.05.

Для молекулярного датирования с помощью байесовского анализа использовали следующие калибровки: 1) время дивергенции между всеми представителями семейства Mustelidae, за исключением подсемейств Mellivorinae и Taxidiinae, равное $11,6 \pm 1$ млн лет, по данным Коерфли с соавт. (2008); 2) возраст находок *M. palerminea* – предка *M. erminea*, равный $1,8 \pm 0,5$ млн лет (King, 1983; Коерфли *et al.*, 2008); 3) время замещения *M. palerminea* современ-

ном видом *M. erminea*, равное $0,78 \pm 0,4$ млн лет (King, 1983). Кроме этого, расчет времени дивергенции проводили с помощью метода ML (пакет программ MEGA 5.05). Использовали модель GTR+G+I и стартовое NJ-дерево, проводили бутстреп-анализ при 1000 итераций. Для эвристического поиска лучших ML-деревьев использовали метод обмена ближайшими соседями (NNI, Nearest-Neighbor-Interchange).

Полученные в настоящей работе нуклеотидные последовательности гена *ND2* горностая депонированы в GenBank под номерами KM196558–KM196562.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В исследованной выборке горностая из Олюторского района Камчатского края у пяти экземпляров обнаружено 5 полиморфных позиций и 4 гаплотипа гена *ND2* (рис. 1). У девяти особей горностая из различных регионов мира выявлены 63 полиморфные позиции, но 3/4 из них (48 позиций) приходится на различия между животными из Евразии и Северной Америки (рис. 1). Уровень дивергенции между гаплотипами мтДНК (*p*-дистанция) американских и евразийских горностаев составил около 5 %, а между гаплотипами горностаев из Евразии – всего 0,5 %.

Результаты филогенетического анализа также свидетельствуют о высокодостоверном в статистическом отношении разделении американских и евразийских линий мтДНК горностая (рис. 2). Между тем внутри евразийской клады мтДНК с высокой статистической поддержкой выделяется только кластер камчатских гаплотипов. Следует отметить, что несмотря на небольшое число проанализированных последовательностей мтДНК, на филогенетическом дереве представлены все основные этапы дивергенции *M. erminea*: разделение на евразийскую и американскую ветви, выделение японской линии и внутриевразийская дифференциация.

Нами проведено молекулярное датирование филогенетической дивергенции мтДНК горностая (табл.). В соответствии с результатами байесовского анализа и ML теста датирование производилось с помощью модели строгих молекулярных часов. Результаты молекулярного датирования, основанные на использовании

Номер образца в GenBank (происхождение)	Полиморфные позиции гена <i>ND2</i>
	111
	11111122222222222222223333344444445555566666777777888899999000
	127801234801112235556922248223557890999924567236668157117799033
	222787307314692552589212484062461614014792138370286926580516858
AB564145 (Новосибирск)	TATTCTCTTTTGGTCCAGTTAGCATACAATTTATCGACACCGACTCTTGCTTATTCGAACGGA
KM196560 (Камчатка)	.G.....C.....C.....G.....G.....A.....
KM196562 (Камчатка)	.G.....C.....C.....G.....G.....A.....
KM196558 (Камчатка)C.C.....C.....G.....A.....G.....
KM196561 (Камчатка)C.....G..C.....G.....A.....G.....
KM196559 (Камчатка)	.G.....C.C.....C.....G.....A.....G.....
AB564146 (Хонсю)	..C.....C..A.....C..G.....G.....G...G
AB564147 (Канада)	C.CCTCTCCCSA.CTT.AC.GAT.C.AGGCC.CT..TCTTAGTCTCC.ACCCCAA.GAAA.
AU750626 (США)	C.CCTCTCCCSA.CTT.AC.GATGC.AGGCCGCT...CTTAG.CTCC.ACCCCAA.GAAA.

Рис. 1. Гаплотипы гена *ND2* у горностая.

Нумерация полиморфных позиций соответствует таковой в нуклеотидной последовательности полного гена *ND2*.

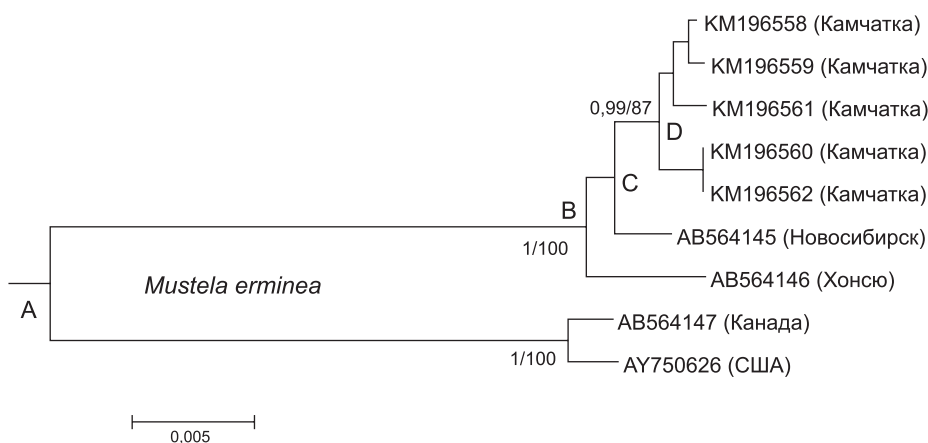


Рис. 2. Филогенетические взаимоотношения (NJ анализ) между гаплотипами гена *ND2* горностая. Внешние группы, использованные для филогенетического анализа, на рисунке не приводятся.

Латинскими буквами отмечены основные филогенетические узлы, для которых в таблице приводятся результаты молекулярного датирования. Числами на ветвях показаны величины статистических поддержек, полученные с помощью байесовского (BPP $\geq 0,95$) и NJ анализа (бутстреп-индекс $\geq 75\%$).

различных калибровок, показали в целом сходные значения эволюционного возраста (табл.). Возраст общего предка *M. erminea* составляет от 0,3 до 1,6 млн лет, а все евразийские линии горностая сходятся к интервалу времени от 0,24 до 0,28 млн лет. Таким образом, разделение между евразийской и американской ветвями произошло в интервале между примерно 0,3 и 1,6 млн лет; для более точных оценок необходимо расширение выборки горностая из Северной Америки. Довольно важным нам

представляется тот факт, что эволюционный возраст гаплотипов мтДНК горностая, обнаруженных всего лишь в одном районе Камчатки, оказался примерно 95–120 тыс. лет, что совершенно не соответствует представлениям об исключительно послеледниковой реколонизации Евразии горностаем, согласно N. Kurose с соавт. (2005). Следует отметить, однако, что данные, полученные N. Kurose с соавт. (2005), основывались на изменчивости главной некодирующей области мтДНК, которая характеризуется более

Таблица

Результаты молекулярного датирования филогенетической дифференциации митохондриальных линий гена *ND2* у горностая

Узлы в филогенетическом дереве *	Молекулярные датировки в млн лет (95 % доверительный интервал)		
	Байесовский анализ		ML анализ
	Калибровка 1	Калибровка 2	Калибровка 3
A	1,635 (1,095–2,215)	1,279 (0,86–1,719)	1,63 (1,175–2,085)
B	0,284 (0,138–0,449)	0,239 (0,116–0,378)	0,249 (0,132–0,366)
C	0,192 (0,087–0,313)	0,169 (0,071–0,269)	0,166 (0,086–0,246)
D	0,12 (0,045–0,207)	0,107 (0,04–0,183)	0,095 (0,04–0,151)

Примечание. Калибровка 1: две точки – $11,6 \pm 1$ и $1,8 \pm 0,5$ млн лет. Калибровка 2: две точки – $11,6 \pm 1$ и $0,78 \pm 0,4$ млн лет. Калибровка 3: одна точка – $11,6 \pm 1$ млн лет. Более подробно см. в разделе «Материалы и методы».
* См. рис. 2.

высоким уровнем гомоплазии из-за большей скорости накопления нуклеотидных замен в сравнении с кодирующей областью (Finnila *et al.*, 2001). Заметим, что гомоплазия, которая включает в себя повторяющиеся в процессе эволюции мутации в одних и тех же сайтах, но в различных филогенетически неродственных линиях ДНК, является одним из артефактов филогенетического анализа, приводящим к увеличению сходства между неродственными линиями ДНК (Malyarchuk *et al.*, 2002; Рогозин и др., 2008). Поэтому гомоплазия мутаций в главной некодирующей области мтДНК вполне могла повлиять на результаты филогенетического анализа и привести к случайной кластеризации гаплотипов горностая независимо от их географического происхождения. Kurose *et al.* (2005) отмечали, что в их филогенетических реконструкциях не наблюдалось кластеров мтДНК, характеризующихся высокой статистической поддержкой.

Необходимо также отметить, что виды характеризуются, как правило, наличием филогенетической структуры, которая проявляется на генных деревьях в виде отчетливых кластеров ДНК (Avice, 1989; Абрамсон, 2007). На выраженность филогеографической структуры влияют скорость миграции и размер популяций (Irwin, 2002). Отсутствие филогеографической структуры может быть связано с быстрым расселением вида по ареалу при отсутствии географических преград: чем выше скорость миграции и межпопуляционного обмена осо-

биями, тем меньшей ожидается степень филогеографической дифференциации (Абрамсон, 2007; Малярчук, 2011). Между тем низкий уровень дифференциации между популяциями и отсутствие взаимосвязей между гаплотипами мтДНК и географическим происхождением наблюдаются и у видов животных, подвергшихся резкому сокращению численности в результате промысла и проведению последующих массовых реакклиматизационных мероприятий, например, у соболя (Рожнов и др., 2010, 2013; Li *et al.*, 2013).

Таким образом, результаты проведенного нами исследования показывают, что предполагаемое негативное влияние последнего ледникового максимума на генетическое разнообразие в евразийских популяциях горностая (Kurose *et al.*, 2005), скорее всего, сильно преувеличено, поскольку анализ другого участка мтДНК (т. е. гена *ND2*) показывает, что даже в относительно небольшой камчатской популяции горностая сохраняется довольно высокий уровень изменчивости, для накопления которой необходим достаточно длительный период времени – около 100 тыс. лет. Для проверки наших выводов, тем не менее, необходимы дальнейшие исследования и увеличение как числа генетических маркеров, так и выборки горностая.

ЛИТЕРАТУРА

- Абрамсон Н.И. Филогеография: итоги, проблемы, перспективы // Информ. вестн. ВОГиС. 2007. Т. 11. № 2. С. 307–331.

- Графодатский А.С., Волобуев В.Т., Терновский Д.В., Раджабли С.И. G-окраска хромосом семи видов куньих (Carnivora, Mustelidae) // Зоол. журнал. 1976. Т. 55. № 11. С. 1704–1709.
- Лушникова Т.П., Омельяничук Л.В., Графодатский А.С. Филогенетические отношения близкородственных видов семейства куницеобразных. Межвидовая изменчивость локализации рестрикционных сайтов BamHI повторов // Генетика. 1989. Т. 25. № 6. С. 1089–1094.
- Малярчук Б.А. Адаптивная внутривидовая дивергенция (на примере гена цитохрома *b* животных) // Генетика. 2011. Т. 47. № 8. С. 1103–1111.
- Павлинов И.Я. Природа России: жизнь животных. Млекопитающие (часть 1). М.: АСТ, 1999. 608 с.
- Рогозин И.Б., Глазко В.И., Кунин Е.В. Молекулярная основа закона рядов гомологической изменчивости Н.И. Вавилова // Информ. вестн. ВОГиС. 2008. Т. 12. № 3. С. 362–371.
- Рожнов В.В., Мещерский И.Г., Пищулина С.Л. и др. Генетический анализ популяций соболя (*Martes zibellina*) и лесной куницы (*M. martes*) в районах совместного обитания на Северном Урале // Генетика. 2010. Т. 46. № 4. С. 553–557.
- Рожнов В.В., Пищулина С.Л., Мещерский И.Г. и др. Генетическая структура соболя (*Martes zibellina* L.) Евразии – анализ распределения митохондриальных линий // Генетика. 2013. Т. 49. № 2. С. 251–258.
- Avice J.C. Gene trees and organismal histories: a phylogenetic approach to the population biology // Evolution. 1989. V. 43. P. 1192–1208.
- Clark P.U., Dyke A.S., Shakun J.D. *et al.* The last glacial maximum // Science. 2009. V. 325. P. 710–714.
- Delisle I., Strobeck C. A phylogeny of the Caniformia (order Carnivora) based on 12 complete protein-coding mitochondrial genes // Mol. Phylogenet. Evol. 2005. V. 37. P. 192–201.
- Domingo-Roura X., Lopez-Giraldez F., Saeki M., Marmi J. Phylogenetic inference and comparative evolution of a complex microsatellite and its flanking regions in carnivores // Genet. Res. 2005. V. 85. P. 223–233.
- Drummond A.J., Suchard M.A., Xie D. *et al.* Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7 // Mol. Biol. Evol. 2012. V. 29. P. 1969–1973.
- Finnila S., Lehtonen M.S., Majamaa K. Phylogenetic network for European mtDNA // Am. J. Hum. Genet. 2001. V. 68. P. 1475–1484.
- Fleming M.A., Cook J.A. Phylogeography of endemic ermine (*Mustela erminea*) in southeast Alaska // Mol. Ecol. 2002. V. 11. P. 795–807.
- Flynn J.J., Finarelli J.A., Zehr S. *et al.* Molecular phylogeny of the Carnivora (Mammalia): Assessing the impact of increased sampling on resolving enigmatic relationships // Syst. Biol. 2005. V. 54. P. 317–337.
- Fulton T.L., Strobeck C. Novel phylogeny of the raccoon family (Procyonidae: Carnivora) based on nuclear and mitochondrial DNA evidence // Mol. Phylogenet. Evol. 2007. V. 43. P. 1171–1177.
- Harding L.E., Smith F.A. Mustela or Vison? Evidence for the taxonomic status of the American mink and a distinct biogeographic radiation of American weasels // Mol. Phylogenet. Evol. 2009. V. 52. P. 632–642.
- Hosoda T., Sato J.J., Lin L.-K. *et al.* Phylogenetic history of mustelid fauna in Taiwan inferred from mitochondrial genetic loci // Can. J. Zool. 2011. V. 89. P. 559–569.
- Hosoda T., Sato J.J., Shimada K.L. *et al.* Independent non-frameshift deletions in the MC1R gene are not associated with melanistic coat coloration in three Mustelid lineages // J. Hered. 2005. V. 96. P. 607–613.
- Irwin D.E. Phylogeographic breaks without geographic barriers to gene flow // Evolution. 2002. V. 56. P. 2383–2394.
- King C.M. *Mustela erminea* // Mammal Sp. 1983. V. 195. P. 1–8.
- Koepfli K.-P., Deere K.A., Slater G.J. *et al.* Multigene phylogeny of the Mustelidae: Resolving relationships, tempo and biogeographic history of a mammalian adaptive radiation // BMC Biol. 2008. V. 6. P. 10.
- Koepfli K.-P., Wayne R.K. Phylogenetic relationships of otters (Carnivora: Mustelidae) based on mitochondrial cytochrome *b* sequences // J. Zool. 1998. V. 246. P. 401–416.
- Kurose N., Abramov A.V., Masuda R. Comparative phylogeography between the ermine *Mustela ermine* and the least weasel *M. nivalis* of Palaearctic and Nearctic regions, based on analysis of mitochondrial DNA control region sequences // Zool. Sci. 2005. V. 22. P. 1069–1078.
- Kurten B., Anderson E. Pleistocene Mammals of North America. N.Y.: Columbia Univ. Press, 1980. 442 p.
- Li B., Malyarchuk B., Ma Z. *et al.* Phylogeography of sable (*Martes zibellina* L. 1758) in the southeast portion of its range based on mitochondrial DNA variation: highlighting the evolutionary history of the sable // Acta Theriol. 2013. V. 58. P. 139–148.
- Malyarchuk B.A., Rogozin I.B., Berikov V.B., Derenko M.V. Analysis of phylogenetically reconstructed mutational spectra in human mitochondrial DNA control region // Hum. Genet. 2002. V. 111. P. 46–53.
- Martinkova N., McDonald R.A., Searle J.B. Stoats (*Mustela erminea*) provide evidence of natural overland colonization of Ireland // Proc. R. Soc. B. 2007. V. 274. P. 1387–1393.
- Sato J.J., Hosoda T., Kryukov A.P. *et al.* Genetic diversity of the sable (*Martes zibellina*, Mustelidae) in Russian Far East and Hokkaido inferred from mitochondrial NADH dehydrogenase subunit 2 gene sequences // Mamm. Stud. 2011. V. 36. P. 209–222.
- Sato J.J., Yasuda S.P., Hosoda T. Genetic diversity of the Japanese marten (*Martes melampus*) and its implications for the conservation unit // Zool. Sci. 2009. V. 26. P. 457–466.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N. *et al.* MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods // Mol. Biol. Evol. 2011. V. 28. P. 2731–2739.
- Xu C.Z., Zhang H.H., Ma J.Z. *et al.* The complete mitochondrial genome of sable, *Martes zibellina* // Mitochondrial DNA. 2012. V. 23. P. 167–169.

**MOLECULAR DATING OF INTRASPECIFIC DIFFERENTIATION
OF THE STOAT (*MUSTELA ERMINEA*) BASED ON THE VARIABILITY
OF THE MITOCHONDRIAL *ND2* GENE**

B.A. Malyarchuk, G.A. Denisova, M.V. Derenko

Institute of Biological Problems of the North, Far-East Branch of Russian Academy of Sciences,
Magadan, Russia, e-mail: malyarchuk@ibpn.ru

Summary

Nucleotide sequences of the NADH dehydrogenase subunit 2 gene (*ND2*) of mitochondrial DNA (mtDNA) were determined in stoats (*Mustela erminea*) from northeastern Kamchatka. Analysis of the data on *ND2* variability in stoats presented here and in earlier studies shows that the divergence level between American and Eurasian mtDNA haplotypes is about 5 %, whereas that among Eurasian ones is as low as 0,5 %. The results of phylogenetic analysis also point to a highly significant differentiation between the American and Eurasian mtDNA lineages, whereas a single Kamchatkan cluster of mtDNA haplotypes is recognized in the Eurasian mtDNA clade with high confidence. Molecular dating shows that the separation of ancestral population of the stoat occurred approximately 1,3–1,6 million years before present (BP), but the Eurasian mtDNA lineages diverged about 300 thousand years (ka) BP. The evolutionary age of Kamchatkan mtDNA haplotypes is about 95–120 ka, which contradicts the suggestions of other authors about post-last glacial (19–26,5 ka BP) recolonization of Eurasia by stoat populations. This inconsistency is discussed.

Key words: stoat, mitochondrial DNA, *ND2* gene, phylogenetic analysis, molecular dating.