

УДК 599.323.4:575.113'311.347

АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ И ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ЛЕСНЫХ МЫШЕЙ РОДА *Sylvaemus* ПО РЕЗУЛЬТАТАМ СЕКВЕНИРОВАНИЯ ФРАГМЕНТА ГЕНА ПЕРВОЙ СУБЪЕДИНИЦЫ ЦИТОХРОМОКСИДАЗЫ

© 2012 г. А. С. Богданов¹, В. В. Стахеев², А. Е. Зыков³, В. В. Якименко⁴, М. Г. Малькова⁴¹Учреждение Российской академии наук Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва 119334
e-mail: bogdalst@yahoo.com²Учреждение Российской академии наук Институт аридных зон Южного научного центра РАН,
Ростов-на-Дону 344006³Зоологический музей Киевского национального университета им. Т. Шевченко, Киев 01601, Украина⁴ФГУН Омский научно-исследовательский институт природно-очаговых инфекций Роспотребнадзора, Омск 644080

Поступила в редакцию 08.04.2011 г.

С целью уточнения характера внутри- и межвидовой дифференциации у нескольких видов лесных мышей рода *Sylvaemus* (*S. uralensis*, *S. sylvaticus*, *S. ponticus*, *S. flavicollis* и *S. fulvipectus*) проанализирована изменчивость нуклеотидной последовательности фрагмента (654 пн) митохондриального гена первой субъединицы цитохромоксидазы (*COI*); проведено сравнение результатов, полученных по нескольким молекулярно-генетическим маркерам. Показана отчетливая обособленность всех видов *Sylvaemus* (включая близких аллопатричных *S. flavicollis* и *S. ponticus*), а также европейской и азиатской рас малой лесной мыши *S. uralensis*, по гену *COI*. Однако генетические различия видов *Sylvaemus* в 1.5 и более раз превышают дистанцию (*D*) между расами *S. uralensis*, что не дает достаточных оснований для выделения последних в самостоятельные виды. Единственный изученный нами экземпляр памиро-алайского подвида *S. uralensis pallipes* оказался наиболее родственен азиатской расе, показав в то же время довольно значительную удаленность от нее (*D* = 0.038). Надежного обособления составляющих европейскую расу *S. uralensis* восточно-европейской и южно-европейской хромосомных форм, а также их предполагаемых гибридов из окрестностей г. Сальск Ростовской области, по гену *COI* не наблюдается. Подтверждено гибридное происхождение популяции малых лесных мышей из окрестностей станции Таллакер Нововаршавского района Омской области, которые предварительно были диагностированы по кариотипическим признакам как отдаленные гибриды восточно-европейской хромосомной формы и азиатской расы. У желтогорлой мыши *S. flavicollis* в пределах России и Украины выявлена слабая дифференциация на северную и южную линии (среднее значение генетической дистанции между ними – 0.020). Существенные отличия относительных значений генетических дистанций между расами *S. uralensis* и парой видов *S. flavicollis*–*S. ponticus*, определенных по митохондриальным генам цитохромоксидазы и цитохрома *b*, указывают на то, что скорость эволюции разных участков митохондриального генома может быть очень несходной. Предполагается, что преобразование гена цитохрома *b* или, по крайней мере, его части происходили неравномерно во времени и/или в разных филетических линиях (т.е. ускоренно при формировании рас малой лесной мыши и замедленно – при становлении *S. flavicollis* и *S. ponticus*).

Группа западно-палеарктических лесных мышей, рассматриваемая многими исследователями в качестве отдельного рода *Sylvaemus*, включает главным образом морфологически сходные, но генетически разобщенные виды [1–15 и др.]. Некоторые из них – широкоареальные обыкновенная лесная мышь *S. sylvaticus* и малая лесная мышь *S. uralensis* – в свою очередь характеризуются сложной генетической изменчивостью и дифференциацией [3–7, 9–19]. Так, у *S. uralensis* описаны азиатская и европейская расы, а в пределах последней – близкие, слабо отличающиеся по количеству крупных прицентромерных ге-

терохроматических блоков и размеру ядерного генома восточно-европейская и южно-европейская хромосомные формы [9, 10, 12–17, 19]. На основании исследования отдельных генетических маркеров разные авторы предлагали считать самостоятельными видами европейскую, азиатскую расы, южно-европейскую хромосомную форму (под наименованиями *S. uralensis* s. str., *S. tokmak*, *S. ciscaucasicus* соответственно) [3, 4, 20] и некоторые подвиды малой лесной мыши – *S. u. mosquensis*, *S. u. kastschenkoi*, *S. u. pallipes* [3–5, 21]; их таксономический статус по-прежнему остается неопределенным. Кроме того, недавно, лишь по

результатам окрашивания гетерохроматина, в окрестностях г. Сальск Ростовской области были диагностированы гибриды восточно-европейской и южно-европейской хромосомных форм [15], а около железнодорожной станции Талапкер Нововаршавского района Омской области – отдаленные гибриды восточно-европейской хромосомной формы и азиатской расы [19, 22]. Таким образом, изучение хромосомных форм/рас, их гибридных популяций, а также вышеперечисленных подвидов *S. uralensis* со спорным таксономическим статусом, требует комплексного молекулярно-генетического анализа.

Оценки различий видов *Sylvaemus* и хромосомных форм/рас малой лесной мыши существенно расходятся. Согласно итогам аллозимного, RAPD-PCR, inter-MIR-PCR анализов [9, 13, 14], генетические дистанции между расами *S. uralensis* не менее чем в 1.5 раза уступают межвидовым, в том числе рассчитанным между наиболее родственными, аллопатричными и зачастую объединявшимися в один вид желтогорлой (*S. flavicollis*) и кавказской (*S. ponticus*) мышами. Однако по данным секвенирования разных фрагментов митохондриального гена цитохрома *b (cytb)* *S. flavicollis* и *S. ponticus* оказались отличающимися примерно в той же мере, как и расы *S. uralensis* [12], или даже практически неразделимыми [23]. Эти несоответствия наводят на мысль о неравномерной скорости эволюции части или всего гена цитохрома *b* у желтогорлой, кавказской мышей, а также у рас *S. uralensis*. Один из путей проверки этого предположения – исследование других митохондриальных генов.

Цель настоящей работы – определение характера и уровня дифференциации видов *Sylvaemus* (включая *S. flavicollis*, *S. ponticus*) и хромосомных форм/рас малой лесной мыши по данным секвенирования митохондриального гена первой субъединицы цитохромоксидазы (*COI*), а также сравнение результатов, полученных по нескольким молекулярно-генетическим маркерам.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В общей сложности исследовано 115 экз. пяти видов *Sylvaemus* – 76 малых лесных мышей (*S. uralensis*), 5 кавказских (*S. ponticus*), 7 желтобрюхих (*S. fulvipectus*), 5 обыкновенных лесных (*S. sylvaticus*) и 22 желтогорлые мыши (*S. flavicollis*); еще по одной особи восточно-азиатской лесной мыши *Apodemus peninsulae*, полевой *Apodemus agrarius*, домовый *Mus musculus* и мыши-малютки *Micromys minutus* использованы в качестве аутгрупп. Пункты отлова лесных мышей рода *Sylvaemus* и объем выборок перечислены ниже, а также представлены на рис. 1 и 2 (локалитеты пронумерованы независимо для каждого вида). Принадлежность особей *S. uralensis* к той или

иной хромосомной форме/расе и гибридным популяциям была предварительно установлена посредством анализа гетерохроматина [3, 4, 15–17, 19, 22], за исключением *S. u. pallipes*: этот подвид, имеющий довольно высокое своеобразие по изменчивым белкам (главным образом – эстеразам) [5, 21] и до сих пор не исследованный с помощью дифференциальных окрасок хромосом, рассматривается нами отдельно.

S. uralensis

Европейская раса, восточно-европейская хромосомная форма

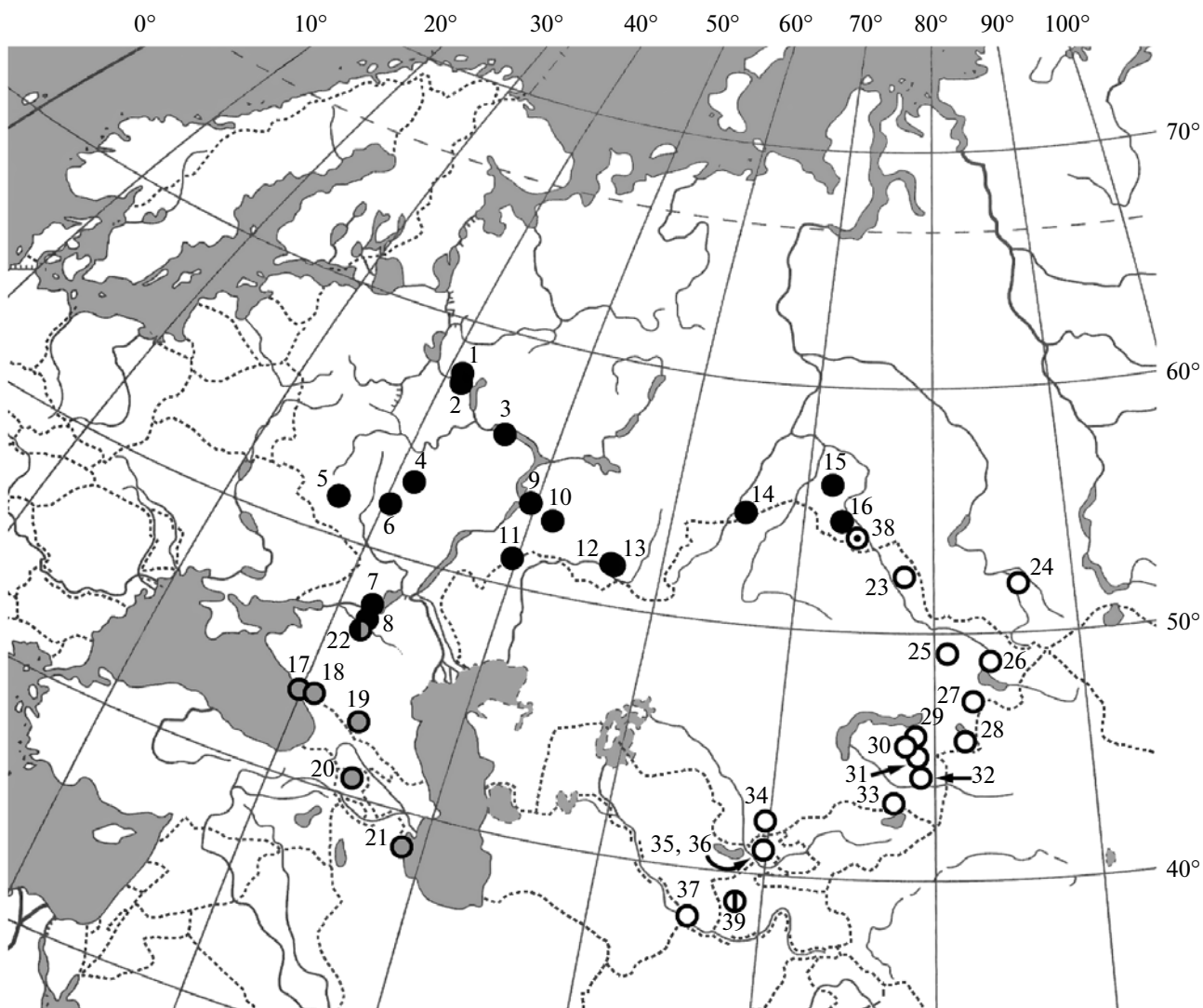
Россия: 1. Костромская обл., 15 км к северу от г. Кострома (2 экз.); 2. Ивановская обл., Приволжский р-н, окраина г. Плес (1 экз.); 3. Республика Чувашия, г. Чебоксары (2 экз.); 4. Рязанская обл., Сараевский р-н, окрестности пос. Алексеевка (2 экз.); 5. Курская обл., Центральное-Черноземный заповедник (1 экз.); 6. Тамбовская обл., Мордовский р-н, окрестности пос. Мордово (2 экз.); 7. Ростовская обл., Цимлянский р-н, окрестности станицы Хорошевская (2 экз.); 8. Ростовская обл., Орловский р-н, окрестности хутора Русский (1 экз.); 9. Самарская обл., Ставропольский р-н, окрестности пос. Бахилова Поляна, Жигулёвский заповедник (2 экз.); 10. Самарская обл., Борский р-н, окрестности пос. Гостёвка и Герасимовка (2 экз.); 11. Саратовская обл., Озинский р-н, окрестности пос. Модин (2 экз.); 12. Оренбургская обл., Кувандыкский р-н, окрестности пос. Канчерово (1 экз.); 13. Оренбургская обл., Кувандыкский р-н, окрестности пос. Бурангулово (1 экз.); 14. Курганская обл., Половинский р-н, окрестности железнодорожной станции Зауралье и пос. Половинное (2 экз.); 15. Омская обл., Тюкалинский р-н, окрестности пос. Старый Конкуль, берег оз. Тенис (2 экз.); 16. Омская обл., Таврический р-н, окрестности железнодорожной станции Амре (2 экз.).

Европейская раса, южно-европейская хромосомная форма

Россия, Краснодарский край, территория, подчиненная г. Сочи: 17. окраина г. Хоста (1 экз.); 18. окрестности пос. Красная Поляна (4 экз.). 19. Россия, Республика Кабардино-Балкария, окраина г. Нальчик (3 экз.). 20. Армения, Лорийская обл., окрестности пос. Лермонтово (2 экз.). 21. Азербайджан, Лерикский р-н, окрестности пос. Оранд, Талыш (2 экз.).

Предполагаемые гибриды восточно-европейской и южно-европейской хромосомных форм

22. Россия, Ростовская обл., Сальский р-н, окрестности г. Сальск (3 экз.).



- Восточно-европейская хромосомная форма *S. uralensis*
- Южно-европейская хромосомная форма *S. uralensis*
- ◐ Предполагаемые гибриды восточно-европейской и южно-европейской хромосомных форм
- Азиатская раса *S. uralensis*
- ◑ Отдаленные гибриды восточно-европейской хромосомной формы и азиатской расы
- ⓪ *S. u. pallipes*

Рис. 1. Пункты отлова исследованных малых лесных мышей *Sylvaemus uralensis* (нумерацию локалитетов см. “Материалы и методы”).

Азиатская раса

23. Казахстан, Павлодарская обл., Павлодарский р-н, 8 км к юго-востоку от пос. Розовка (1 экз.). 24. Россия, Республика Алтай, северо-за-

падная окраина г. Горно-Алтайск (*S. u. kastschenko*, 2 экз.). Казахстан, Восточно-Казахстанская обл.: 25. Жарминский р-н, окрестности пос. Каратубе, Калбинский хребет, горы Каратубе

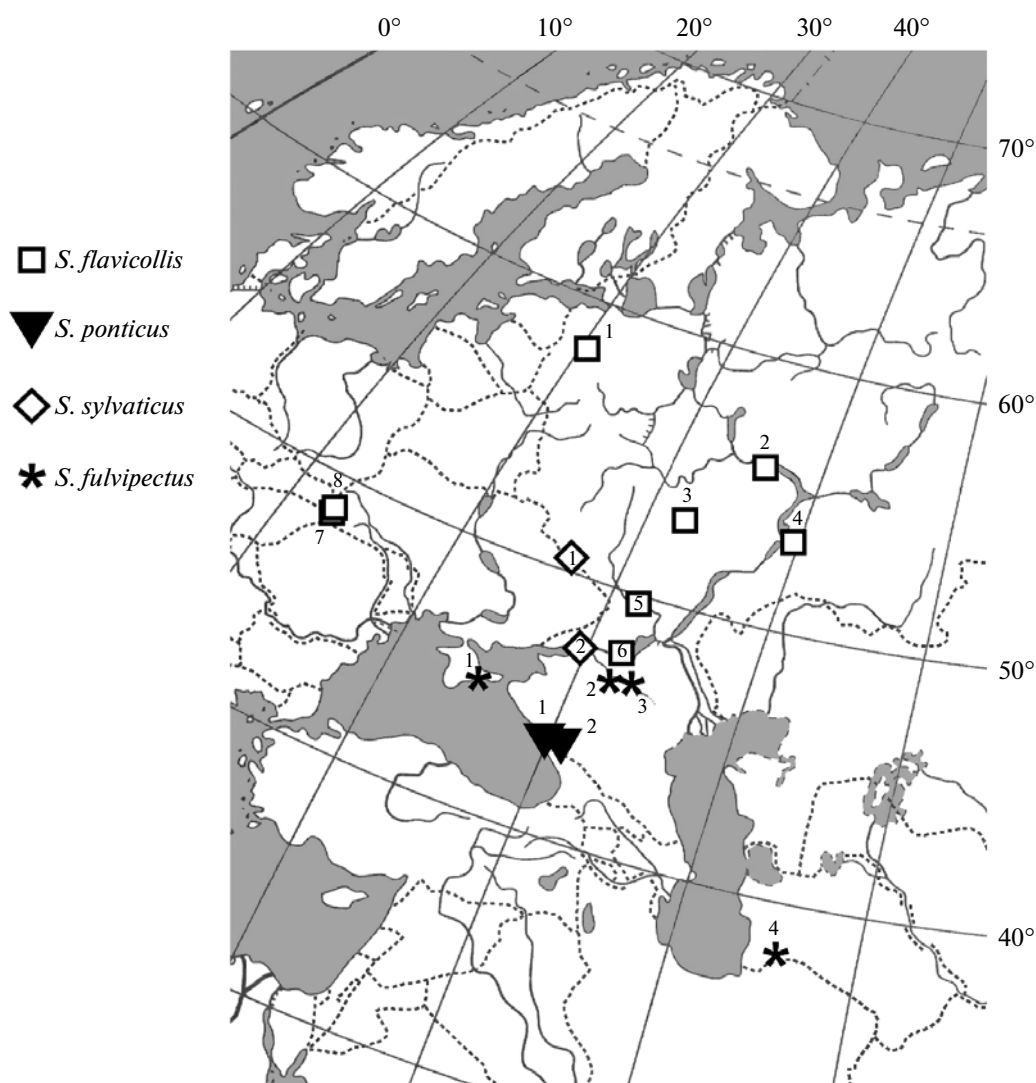


Рис. 2. Пункты отлова исследованных экземпляров *Sylvaemus flavicollis*, *S. sylvaticus*, *S. ponticus* и *S. fulvipectus*. Нумерация локалитетов приведена независимо для каждого вида (см. "Материалы и методы").

(2 экз.); **26.** Курчумский р-н, около 15 км к северо-востоку от пос. Куйган, отроги Нарымского хребта (2 экз.); **27.** Тарбагатайский р-н, около 30 км к юго-западу от пос. Аксуат, хребет Тарбагатай, пойма р. Карабуга (1 экз.). Казахстан, Алматинская обл.: **28.** Алакольский р-н, окрестности пос. Бибакан, Джунгарский Алатау, пойма р. Орта-Тентек (2 экз.); **29.** Аксуйский р-н, 33 км от пос. Матай в сторону пос. Кураксу, пойма р. Аксу (1 экз.); **30.** Каратальский р-н, 28 км к северо-западу от г. Уштобе, пойма р. Каратал (1 экз.); **31.** Кербулакский р-н, около 10 км к северо-востоку от пос. Рудничный, Джунгарский Алатау (1 экз.); **32.** Кербулакский р-н, хребет Алтын-нәмел, перевал Алтын-нәмел (1 экз.); **33.** Карасайский р-н, около 20 км к югу от г. Каскелен, Заилийский Алатау, пойма р. Каскелен (2 экз.). **34.** Казахстан, Южно-Казахстанская обл., Сай-

рамский р-н, окрестности пос. Кызылқишлак (1 экз.). Узбекистан, Ташкентская обл., Кураминский хребет: **35.** перевал Чапанкуйды (2 экз.); **36.** долина р. Ангрэн в 35 км выше по течению от г. Ангрэн (1 экз.). **37.** Туркменистан, Лебапский велаят, хребет Кугитанг, гора Айрыбаба и прилегающие территории: ущелье Дарай-Дара, окрестности пос. Свинцовый Рудник; ущелье Кырккыз, окрестности пос. Ходжайпиль (3 экз.).

Отдаленные гибриды восточно-европейской хромосомной формы и азиатской расы

38. Россия, Омская обл., Нововаршавский р-н, окрестности железнодорожной станции Талапкер (10 экз.).

S. uralensis pallipes

39. Таджикистан, Варзобский р-н, окрестности пос. Ходжа-Оби-Гарм (1 экз.).

S. flavicollis

Россия: 1. Новгородская обл., Солецкий р-н, около 60 км к юго-западу от Новгорода, пойма р. Шелонь (1 экз.); 2. Республика Чувашия, г. Чебоксары (1 экз.); 3. Пензенская обл., Белинский р-н, окрестности пос. Ширяево (2 экз.); 4. Самарская обл., Ставропольский р-н, окрестности пос. Бахилова Поляна, Жигулевский заповедник (1 экз.); 5. Ростовская обл., Шолоховский р-н, окрестности станицы Вешенская (2 экз.); 6. Ростовская обл., Цимлянский р-н, окрестности станицы Лозновская, природный парк “Донской” (1 экз.). Украина, Закарпатская обл.: 7. Свалявский р-н, окрестности г. Свалява (4 экз.); 8. Воловецкий р-н, окрестности пос. Воловец (10 экз.).

S. ponticus

Россия, Краснодарский край, территория, подчиненная г. Сочи: 1. окраина г. Хоста (2 экз.); 2. окрестности пос. Красная Поляна (3 экз.).

S. sylvaticus

(хромосомная форма “*vohlynensis*” с низким содержанием в кариотипе прицентромерного гетерохроматина)

Россия: 1. Белгородская обл., Борисовский р-н, окрестности пос. Борисовка (1 экз.); 2. г. Ростовна-Дону (4 экз.).

S. fulvipectus

1. Украина, п-ов Крым, Феодосийский р-н, окраина пос. Приморский (2 экз.). Россия, Ростовская обл.: 2. Сальский р-н, земли совхоза “Маяк” (1 экз.); 3. Орловский р-н, окрестности пос. Маныч (1 экз.). 4. Туркменистан, Балканский велаят, хребет Копетдаг, Сянт-Хасардагский заповедник (3 экз.).

Секвенирование *COI* проведено в рамках Международной программы “Barcoding” в Канадском центре ДНК-штрихкодирования (Canadian Centre for DNA Barcoding), по стандартной технологии [24, 25]. Длина проанализированной последовательности составила 654 пн. Построение дендрограммы, демонстрирующей различия между видами *Sylvaemus* и хромосомными формами/расами *S. uralensis*, выполнено по алгоритму “ближайшего связывания” (Neighbor Joining – NJ). Расчет генетических дистанций (*D*) производился по двухпараметрической модели Кимуры; учитывались как транзиции, так и трансверсии во

всех положениях кодонов. Значения бутстреп-индекса определены при проведении 1000 репликаций. Указанная выше статистическая обработка данных выполнена при использовании компьютерной программы Mega 3.1. Кроме того, для сборных выборок особей всех внутривидовых группировок и видов с помощью программы Arlequin 3.11 рассчитаны величины нескольких показателей генетического разнообразия: количество гаплотипов и полиморфных локусов, среднее число замен на локус, нуклеотидное (π) и гаплотипическое (H) разнообразие.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Виды *Sylvaemus* оказались существенно удалены от представителей других родов подсемейства Murinae, в том числе – от полевой (*Apodemus agrarius*) и восточно-азиатской лесной (*Apodemus peninsulae*) мышей (табл. 1, 2, рис. 3). Этот результат подтверждает значительную генетическую разобщенность западно-палеарктических и восточно-палеарктических видов лесных мышей и поддерживает точку зрения о целесообразности их разделения на два рода – *Sylvaemus* и *Apodemus*, соответственно [26]. Среди видов *Sylvaemus* базальное положение на дендрограмме занимают обыкновенная лесная мышь *S. sylvaticus* и желтобрюхая мышь *S. fulvipectus*. Отличаясь в наибольшей степени от других взятых в исследование западно-палеарктических лесных мышей, *S. sylvaticus* и *S. fulvipectus*, по-видимому, имеют самое давнее происхождение. Аналогичный результат был получен при дополнительном сравнении одинаковых по объему выборок видов *Sylvaemus*.

Все виды западно-палеарктических лесных мышей (включая *S. flavicollis* и *S. ponticus*), а также европейская и азиатская расы *S. uralensis* образовали на древе отчетливые кластеры с высокой статистической поддержкой: значения бутстреп-индекса – 97–100% (рис. 3). Несмотря на явную обособленность рас малой лесной мыши, генетические различия между ними ($D = 0.047$) почти в 1.5 раза ниже минимальной дистанции, полученной при сопоставлении видов *Sylvaemus* (в наименьшей степени отличаются друг от друга близкие *S. flavicollis* и *S. ponticus*: $D = 0.065$). Таким образом, анализ *COI* не дает достаточных оснований для выделения в самостоятельные виды рас *S. uralensis*. На их конспецифичность указывают также результаты сравнительного исследования аллозимов [9] и повторяющихся последовательностей ДНК прицентромерных районов хромосом [19, 27]: в противоположность желтогорлой и кавказской мышам отчетливые качественные изменения в составе ДНК-повторов у рас *S. uralensis* пока не продемонстрированы.

Азиатская раса малой лесной мыши характеризуется примерно такой же изменчивостью *COI*,

Таблица 1. Значения средних генетических дистанций (D , $\times 100$), рассчитанных по нуклеотидной последовательности фрагмента *COI* при сравнении хромосомных форм/рас малой лесной мыши *S. uralensis* и других видов *Sylvaemus*

Виды и внутривидовые группировки			ur				BE \times A	BE \times ЮЕ	flav $D_{I-II} = 2.0$	pon	fulv	sylv	agr	pen	mus
			E		A + pal										
			BE	ЮЕ	A	pal									
ur	E	BE	—	4.7											
		ЮЕ	0.7	—	5.7*										
	A	4.7		—											
		27.4**													
		4.7	4.7	—											
	pal	5.4		—											
		5.3	5.6	3.8	—										
	BE \times A	1.1		4.1		—									
		1.1	1.2	4.0	5.1										
	BE \times ЮЕ	0.6		4.7		1.0	—								
0.6		0.6	4.7	5.2											
flav	8.3				7.5	7.3	—								
	7.4		10.3												
	7.4	7.4	10.3	11.4											
pon	9.2				8.7	8.5	6.5 5.2* 41.6**	—							
	8.6		10.4												
	8.5	8.8	10.3	12.5											
fulv	9.0				8.7	8.8	10.0	10.0	—						
	8.8		9.5												
	8.8	8.9	9.5	11.7											
sylv	11.6				11.1	11.2	13.2	11.0	9.5	—					
	11.2		12.5												
	11.2	11.3	12.5	13.6											
agr	18.0				17.2	17.5	16.3	18.3	16.7	17.1	—				
	17.5		19.1												
	17.5	17.3	19.1	20.1											
pen	16.0				15.6	15.5	14.8	15.8	14.8	15.6	15.2	—			
	15.5		17.1												
	15.4	15.6	17.0	18.0											
mus	15.2				14.9	14.9	15.3	16.0	17.0	17.9	16.7	15.4	—		
	14.9		15.8												
	14.9	15.0	15.8	16.3											
min	18.1				17.4	17.7	18.0	17.1	20.3	21.3	18.9	19.9	17.2		
	17.7		19.0												
	17.6	17.7	18.9	20.7											

Примечание. Сокращения и обозначения: ur – *Sylvaemus uralensis*, pal – *S. uralensis pallipes*, flav – *S. flavicollis*, pon – *S. ponticus*, fulv – *S. fulvipectus*, sylv – *S. sylvaticus*, agr – *Apodemus agrarius*, pen – *A. peninsulae*, mus – *Mus musculus*, min – *Micromys minutus*. E – европейская, A – азиатская расы *S. uralensis*; BE – восточно-европейская, ЮЕ – южно-европейская хромосомные формы европейской расы; BE \times A – выборка отдаленных гибридов восточно-европейской хромосомной формы и азиатской расы из окрестностей станции Талапкер Омской обл., BE \times ЮЕ – предполагаемые гибриды восточно-европейской и южно-европейской хромосомных форм из окрестностей г. Сальск Ростовской обл. Для сравнения указаны величины дистанций ($\times 100$), которые были рассчитаны по результатам исследований: * – изменчивости фрагмента (408 пн) гена цитохрома *b* [12]; ** – inter-MIR-PCR анализа (дистанция определена по формуле Неи и Ли) [13]. D_{I-II} – дистанция между группами особей *S. flavicollis*, образующих кластеры I и II на дендрограмме (см. рис. 3).

как и европейская (табл. 3). Примечательно, что при анализе *cytb* были получены данные о более высоком полиморфизме европейской расы в сравнении с азиатской [20].

Единственная изученная нами лесная мышь из Таджикистана, принадлежащая к памиро-алайскому подвиду *S. uralensis pallipes*, по последовательности *COI* оказалась наиболее родственной азиатской расе, показав в то же время довольно значительную обособленность от нее ($D = 0.038$). Похожий результат был получен ранее при исследовании *cytb* [12]. Включение памиро-алайского экземпляра в общую выборку малых лесных мышей азиатской расы заметно повышает значения показателей генетического разнообразия, хотя практически не сказывается на уровне отличий от европейской расы *S. uralensis* и от других видов. Не подтверждаю мнение С.В. Межжерина о видовой самостоятельности *S. uralensis pallipes* [5, 21], мы пока не можем определить степень родства этого подвида и азиатской расы: возможно как то, что между ними существуют еще не обнаруженные “переходные” популяции, так и то, что *S. uralensis pallipes* представляет собой отдельную генетическую форму *S. uralensis*. Для решения этого вопроса необходимо комплексное исследование ряда популяций малых лесных мышей Памиро-Алая и близлежащих территорий.

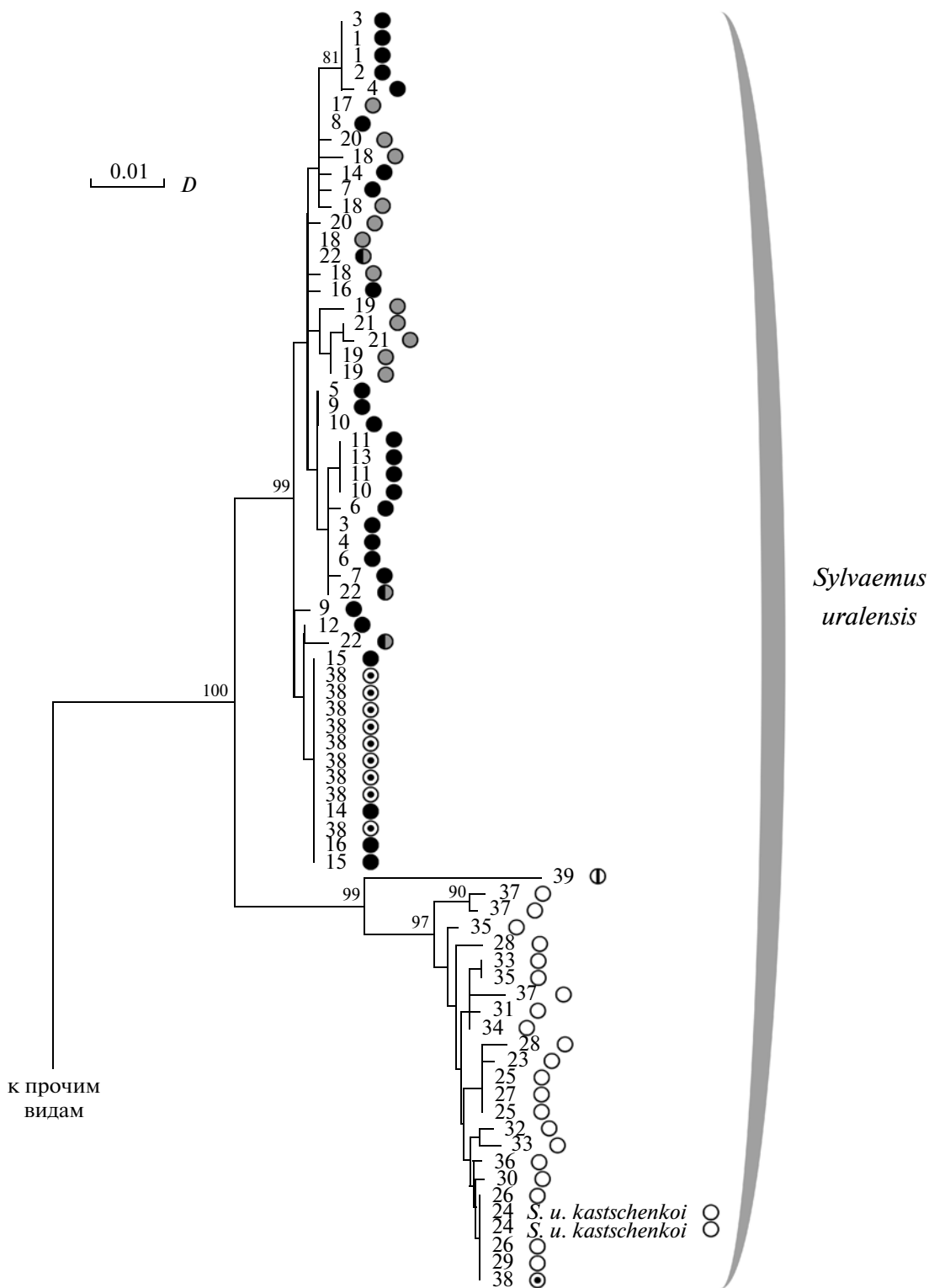
Особи алтайского подвида *S. uralensis kastschenkoi*, также выделенного С.В. Межжериним в самостоятельный вид [5], диагностируются по последовательности *COI* и прицентромерным гетерохроматическим сегментам хромосом [19] как типичные представители азиатской расы.

Хотя малые лесные мыши южно-европейской хромосомной формы и образуют довольно компактную группу внутри кластера европейской расы, полного обособления восточно-европейской и южно-европейской хромосомных форм не наблюдается, что противоречит мнению о видовом статусе подвидов *S. uralensis ciscaucasicus* и входящего в состав восточно-европейской формы *S. uralensis mosquensis* [3, 4]. Предполагаемые гибриды хромосомных форм европейской расы, выявленные в окрестностях г. Сальск Ростовской области при анализе прицентромерного гетерохроматина [15], распределяются внутри этого же кластера случайно. Локализация одного экземпляра из окрестностей г. Сальск в пределах группы малых лесных мышей южно-европейской хромосомной формы, а двух других особей — вне ее, может рассматриваться как дополнительный (но не достаточный) аргумент в пользу гибридного происхождения данной популяции. Для малых лесных мышей большей части других выборок европейской или азиатской расы характерно неупорядоченное расположение на древе. По-видимому, анализ *COI* (как и

cytb, *inter-MIR-PCR*-фрагментов, *RAPD-PCR*-фрагментов) не обладает необходимым “разрешением” для надежного разделения восточно-европейской и южно-европейской хромосомных форм, а также популяций в пределах каждой из рас *S. uralensis*, и для этих целей необходимы подбор более “чувствительного” молекулярно-генетического маркера или использование комплекса признаков.

Особого внимания заслуживает выборка малых лесных мышей из окрестностей железнодорожной станции Талапкер Нововаршавского района Омской области. Ранее, при анализе прицентромерного гетерохроматина, эти экземпляры были диагностированы как отдаленные гибриды восточно-европейской хромосомной формы и азиатской расы, имеющие большее сходство с последней [19, 22]. Однако на дендрограмме, построенной по результатам секвенирования *COI*, почти все малые лесные мыши указанной выборки, кроме одного экземпляра, вошли в кластер, соответствующий европейской расе *S. uralensis*, показав при этом наибольшую близость к особям восточно-европейской хромосомной формы из Омской и Курганской областей. Несовпадение результатов, полученных при анализе ядерных и митохондриального маркеров, а также гетерогенность выборки из окрестностей станции Талапкер по специфичным для разных рас митотипам *COI* (рис. 3, табл. 3) доказывают ее гибридное происхождение.

Желтогорлые мыши *S. flavicollis* из нескольких пунктов России и Украины распределились по последовательности *COI* в две группы (кластеры I и II на дендрограмме), слабо, но явно обособленные друг от друга: значение средней генетической дистанции между ними — 0.020 (рис. 3, табл. 1, 2). Гетерогенность группы II существенно выше в сравнении с группой I (табл. 3). По их составу, в пределах указанной территории, прослеживается дифференциация популяций желтогорлой мыши на северную и южную линии, однако — не вполне отчетливая; более того, особи одной из выборок вошли в оба кластера. Причиной этого может быть неполная сортировка гаплотипов либо гибридизация внутривидовых линий в местах их контактов. Разобщенность I и II групп гаплотипов обусловлена заменами нуклеотидов в 15 сайтах (причем различия “фиксированы” по трем транзициям и трем трансверсиям). Изменяемые сайты достаточно равномерно распределены по всей длине фрагмента *COI*. Интересно, что по гену цитохрома *b* наблюдается похожая дифференциация *S. flavicollis*, но в данном случае “смешение” гаплотипов, входящих в разные кластеры на дендрограммах, отмечено в выборках из нескольких пунктов Южной, Центральной, Северной и Во-



- Восточно-европейская хромосомная форма *S. uralensis*
- Южно-европейская хромосомная форма *S. uralensis*
- ◐ Предполагаемые гибриды восточно-европейской и южно-европейской хромосомных форм
- Азиатская раса *S. uralensis*
- ⊙ Отдаленные гибриды восточно-европейской хромосомной формы и азиатской расы
- ⓧ *S. u. pallipes*

Рис. 3. NJ-дендрограмма, построенная при сравнении нуклеотидных последовательностей фрагмента гена цитохромоксидазы отдельных особей нескольких видов лесных мышей рода *Sylvaemus*. Справа от ветвей дендрограммы указаны номера пунктов отлова животных. Нумерация локалитетов приведена независимо для каждого вида *Sylvaemus* (см. “Материалы и методы”). В узлах ветвления дерева указаны значения бутстреп-индекса, превышающие 70%. *D* – масштабная шкала генетических дистанций.

сточной Европы [18]. Возникновение такой изменчивости двух митохондриальных генов у желтогорлой мыши, возможно, обусловлено фрагментацией ареала вида во время последнего ледникового периода плейстоцена (по-видимому, лишь на завершающей, самой холодной стадии), независимой эволюцией изолированных популяционных группировок, а затем – их объединением и широким распространением по территории Европы в голоцене [18]. Также не исключено, что “промежуточные” гаплотипы бы-

ли устранены отбором вследствие их невысокой функциональной ценности.

Интересна очень слабая изменчивость *COI* у желтобрюхих мышей *S. fulvipectus*, несмотря на значительную географическую удаленность изученных популяций (рис. 2, 3, табл. 3). Сходные данные были получены ранее при анализе *cytb* [12, 15], а также гетерохроматических и ядрышкообразующих районов хромосом [3, 4, 6, 15, 28]. По-видимому, низкий генетический полиморфизм этого вида обусловлен тем, что его широ-

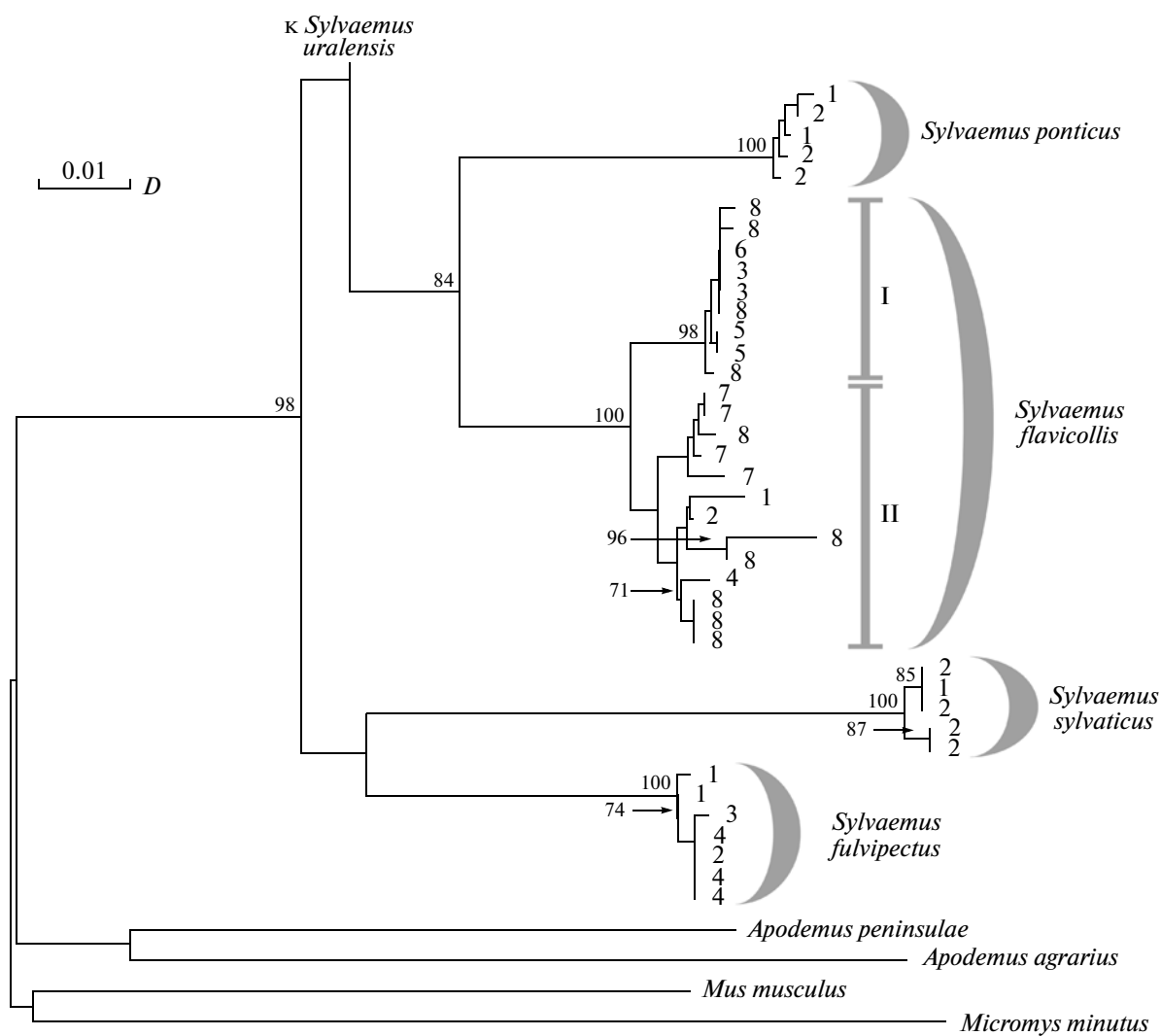


Рис. 3. Окончание.

Таблица 2. Значения стандартных ошибок (St. er., $\times 100$) средних генетических дистанций, рассчитанных по нуклеотидной последовательности фрагмента *COI* при сравнении хромосомных форм/рас малой лесной мыши *S. uralensis* и других видов *Sylvaemus*

Виды и внутривидовые группировки		ur						flav St. er. _{I-II} = = 0.4	pon	fulv	sylv	agr	pen	mus
		E		A + pal		BE \times A	BE \times ЮЕ							
		BE	ЮЕ	A	pal									
ur	E	BE	–	0.8										
		ЮЕ	0.2	–										
	A	0.8		–										
		0.8	0.8	–										
	pal	0.9		–										
		0.9	0.9	0.8	–									
BE \times A	0.2		0.7		–									
	0.3	0.3	0.7	0.9										
BE \times ЮЕ	0.2		0.8		0.3	–								
	0.2	0.2	0.8	0.9										
flav	1.1						1.0	1.0	–					
	1.0		1.3											
	1.0	1.0	1.3	1.3										
pon	1.1						1.1	1.1	1.0	–				
	1.1		1.3											
	1.1	1.1	1.3	1.5										
fulv	1.2						1.2	1.2	1.3	1.3	–			
	1.2		1.3											
	1.2	1.2	1.2	1.4										
sylv	1.4						1.4	1.4	1.5	1.3	1.3	–		
	1.3		1.5											
	1.4	1.4	1.5	1.6										
agr	1.8						1.7	1.7	1.6	1.7	1.7	1.7	–	
	1.7		1.8											
	1.7	1.7	1.8	1.9										
pen	1.6						1.6	1.6	1.5	1.6	1.7	1.7	1.7	1.7
	1.6		1.8											
	1.6	1.6	1.8	1.8										
mus	1.6						1.6	1.6	1.5	1.6	1.7	1.8	1.7	1.6
	1.5		1.7											
	1.6	1.6	1.7	1.7										
min	1.8						1.8	1.8	1.8	1.7	2.0	2.1	1.8	2.0
	1.7		1.9											
	1.8	1.8	1.9	2.0										

Примечание. Сокращения названий видов и внутривидовых группировок см. в подписи к табл. 1. St. er. I–II – стандартная ошибка дистанции между группами особей *S. flavicollis*, образующих кластеры I и II на дендрограмме (см. рис. 3).

Таблица 3. Значения показателей генетического разнообразия, рассчитанные по нуклеотидной последовательности фрагмента *COI* в пределах внутривидовых групп и видов

Параметры генетического разнообразия выборок	Виды и внутривидовые группировки										
	ur					flav		pon	fulv	sylv	
	E		A + pal		BE × A	BE × ЮЕ	I				II
	BE	ЮЕ	A	pal							
Количество исследованных экземпляров (последовательностей)	76					22		5	7	5	
	39 (23)		24		10	3	9				13 (9)
	27	12	23	1							
Количество полиморфных локусов	72					34		4	3	3	
	26 (17)		44		28	6	4				25 (17)
	14	13	25	—							
Количество гаплотипов	43					15		5	4	2	
	24 (15)		18		2	3	5				10 (8)
	14	11	17	1							
Гаплотипическое разнообразие, $H \pm$ среднее квадратическое отклонение	0.958 ± 0.014					0.952 ± 0.029		1.000 ± ± 0.127	0.714 ± ± 0.181	0.600 ± ± 0.175	
	0.965 ± 0.014 (0.957 ± 0.024)		0.953 ± 0.032		0.200 ± ± 0.154	1.000 ± ± 0.272	0.806 ± ± 0.120				0.949 ± ± 0.051 (0.972 ± ± 0.064)
	0.932 ± ± 0.025	0.985 ± ± 0.040	0.949 ± ± 0.034	—							
Среднее генное разнообразие по всем локусам (нуклеотидное разнообразие), $\pi \pm$ среднее квадратическое отклонение (×100)	2.358 ± 1.179					1.325 ± 0.707		0.245 ± ± 0.199	0.160 ± ± 0.137	0.275 ± ± 0.218	
	0.603 ± 0.342 (0.614 ± 0.354)		0.855 ± 0.473		0.856 ± ± 0.504	0.612 ± ± 0.504	0.161 ± ± 0.133				0.929 ± ± 0.529 (0.841 ± ± 0.502)
	0.572 ± ± 0.331	0.505 ± ± 0.312	0.603 ± ± 0.349	—							
Среднее число замен на локус ± ± среднее квадратическое отклонение	1.115 ± 0.333					1.052 ± 0.222		1.006 ± ± 0.078	1.005 ± ± 0.068	1.005 ± ± 0.068	
	1.040 ± 0.195 (1.026 ± 0.159)		1.067 ± 0.251		1.043 ± ± 0.202	1.009 ± ± 0.095	1.006 ± ± 0.078				1.038 ± ± 0.192 (1.026 ± ± 0.159)
	1.021 ± ± 0.145	1.020 ± ± 0.140	1.038 ± ± 0.192	—							
Средняя внутривыборочная генетическая дистанция ± ± стандартная ошибка (×100)	2.4 ± 0.4					1.3 ± 0.3		0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.2	
	0.6 ± 0.1 (0.6 ± 0.2)		0.9 ± 0.2		0.9 ± 0.2	0.6 ± 0.3	0.2 ± 0.1				0.9 ± 0.2 (0.8 ± ± 0.2)
	0.6 ± 0.2	0.5 ± 0.1	0.6 ± 0.1	—							

Примечание. Сокращения названий видов и внутривидовых группировок см. в подписи к табл. 1. I и II – группы особей *S. flavicollis*, образующих соответствующие кластеры на дендрограмме (см. рис. 3). Для более корректного сопоставления величин параметров генетического разнообразия сформирована дополнительная выборка малых лесных мышей европейской расы (с охватом всех пунктов отлова), равная по размеру таковой азиатской расы (23 экз.); значения, рассчитанные для этой дополнительной выборки, приведены в скобках. Аналогичное выравнивание выборок по объему (по 9 экз.) выполнено для I и II групп особей *S. flavicollis*.

кое распространение произошло быстро и в недавнем прошлом (скорее всего, во время климатического оптимума голоцена, 7–4.5 тыс. лет назад). Также возможно, что в истории *S. fulvireptus* значительную роль играли эффекты “основателя” и “бутылочного горлышка”.

В целом следует отметить хорошее соответствие топологии древ, построенных по данным секвенирования *COI* и *cytb*, а также аллозимного, inter-MIR-PCR и RAPD-PCR анализов [9, 12–14]. Тем не менее относительные значения генетических дистанций между расами *S. uralensis* и парой видов *S. flavicollis*–*S. ponticus*, определенные по фрагментам двух митохондриальных генов, оказались заметно отличающимися (*COI* – 0.047/0.065 = 0.72; *cytb* – 0.057/0.052 = 1.10), а наиболее близкое соотношение дистанций было получено при мультилокусном анализе ядерной ДНК методом inter-MIR-PCR (0.274/0.416 = 0.66) и исследовании *COI* (табл. 1). Это говорит о том, что скорость эволюции разных участков митохондриального генома может быть очень несходной. Применительно к ранее изученному фрагменту *cytb* [12] есть основания полагать, что его преобразования происходили неравномерно во времени и/или в разных филетических линиях (т.е. ускоренно при формировании рас малой лесной мыши и замедленно – при становлении *S. flavicollis* и *S. ponticus*). Учитывая практически одинаковые значения дистанций между расами малой лесной мыши, определенные по полной последовательности *cytb* и его участку [12, 20], нельзя исключить того, что подобная неравномерность эволюционных изменений свойственна гену цитохрома *b* в целом. Поэтому желательна дополнительная проверка этой гипотезы анализом полиморфизма всего гена *cytb* у особей *S. flavicollis*, *S. ponticus*, рас *S. uralensis* и представителей других видов лесных мышей посредством специальных тестов. При ее подтверждении, возможно, потребуется пересмотр предпринятых по данным секвенирования *cytb* заключений о видовом статусе рас малой лесной мыши [20] и датировок времени дивергенции с использованием молекулярных часов без учета неравномерной скорости эволюции гена [12, 20].

Выражаем искреннюю признательность А.В. Борисенко, Н.В. Ивановой и Полу Эберу (Dr. Paul D.N. Hebert) за проведение секвенирования гена цитохромоксидазы, которое осуществлено за счет грантов Канадского Национального совета по науке и технике (Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada) и фонда “Genome Canada” при посредничестве Института генетики Онтарио (Ontario Genomics Institute); дополнительное финансирование предоставлено Канадским фондом инноваций

(Canada Foundation for Innovation) и Инновационным трестом Онтарио (Ontario Innovation Trust). Часть животных любезно передана нам В.В. Марочкиной (Амударьинский заповедник), В.С. Лукаревским, Ю.М. Ковальской, Н.М. Окуловой, А.Е. Балакиревым (Институт проблем экологии и эволюции РАН), И.Ю. Баклушинской (Институт биологии развития РАН), В.М. Малыгиным, А.А. Банниковой (Московский государственный университет, биологический факультет) и В.С. Лебедевым (Зоологический музей Московского государственного университета). Также благодарим О.В. Брандлера (Институт биологии развития РАН), А.Ю. Пузаченко (Институт географии РАН), С.Б. Поле (Казахский научный центр карантинных и зоонозных инфекций), П.А. Тильбу, Б.С. Туниева (Сочинский национальный парк), Р.И. Дзюева (Кабардино-Балкарский государственный университет), О.В. Митропольского (Узбекская противочумная станция), А.А. Власова (Центрально-Черноземный заповедник), В.П. Вехника (Жигулевский заповедник), Е.И. Жолнеровскую (Институт систематики и экологии животных СО РАН) и В.И. Ермолаева (Институт цитологии и генетики СО РАН) за содействие, оказанное при отлове мышей и лабораторной обработке материала.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и Президиума РАН (программа “Динамика генофондов”).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Межжерин С.В., Зыков А.Е. Генетическая дивергенция и аллозимная изменчивость мышей рода *Apodemus* s. lato (Muridae, Rodentia) // Цитология и генетика. 1991. Т. 25. № 4. С. 51–59.
2. Воронцов Н.Н., Боекорсов Г.Г., Межжерин С.В. и др. Систематика лесных мышей подрода *Sylvaemus* Кавказа (Mammalia, Rodentia, *Apodemus*) // Зоол. журн. 1992. Т. 71. Вып. 3. С. 119–131.
3. Орлов В.Н., Козловский А.И., Наджафова Р.С., Булатова Н.Ш. Хромосомные диагнозы и место генетических таксонов в эволюционной классификации лесных мышей подрода *Sylvaemus* Европы (*Apodemus*, Muridae, Rodentia) // Зоол. журн. 1996. Т. 75. Вып. 1. С. 88–102.
4. Orlov V.N., Bulatova N.Sh., Nadjafova R.S., Kozlovsky A.I. Evolutionary classification of European wood mice of the subgenus *Sylvaemus* based on allozyme and chromosome data // Bonner Zoologische Beiträge. 1996. В. 46. Н. 1–4. S. 191–202.
5. Межжерин С.В. Ревизия мышей рода *Apodemus* (Rodentia, Muridae) Северной Евразии // Вестник зоологии. 1997. Т. 31. № 4. С. 29–41.
6. Картавцева И.В. Кариосистематика лесных и полевых мышей (Rodentia: Muridae). Владивосток: Дальнаука, 2002. 141 с.

7. *Filippucci M.G., Macholan M., Michaux J.R.* Genetic variation and evolution in the genus *Apodemus* (Muridae: Rodentia) // *Biol. J. Linnean Society*. 2002. V. 75. № 3. P. 395–419.
8. *Michaux J.R., Chevret P., Filippucci M.-G., Macholan M.* Phylogeny of the genus *Apodemus* with a special emphasis on the subgenus *Sylvaemus* using the nuclear IRBP gene and two mitochondrial markers: cytochrome *b* and 12S rRNA // *Mol. Phylogen. Evolution*. 2002. V. 23. P. 123–136.
9. *Богданов А.С.* Аллозимная изменчивость малой лесной мыши *Sylvaemus uralensis* (Rodentia, Muridae) и оценка уровня дивергенции хромосомных форм этого вида // *Генетика*. 2004. Т. 40. № 8. С. 1099–1112.
10. *Челомина Г.Н.* Лесные и полевые мыши: молекулярно-генетические аспекты эволюции и систематики. Владивосток: Дальнаука, 2005. 204 с.
11. *Hooper S.R., Gaschak S., Dunina-Barkovskaya Y. et al.* New information for systematics, taxonomy, and phylogeography of the rodent genus *Apodemus* (*Sylvaemus*) in Ukraine // *J. Mammalogy*. 2007. V. 88. № 2. P. 330–342.
12. *Челомина Г.Н., Атопкин Д.М., Богданов А.С.* Филогенетические связи видов и внутривидовых форм лесных мышей рода *Sylvaemus* по данным частичного секвенирования гена цитохрома *b* митохондриальной ДНК // *ДАН*. 2007. Т. 416. № 2. С. 282–285.
13. *Богданов А.С., Банникова А.А., Крамеров Д.А.* Исследование дифференциации и внутривидовых филогенетических связей у малой лесной мыши *Sylvaemus uralensis* методом inter-MIR-PCR // *Современные проблемы биологической эволюции: Материалы конф. М.: Изд-во Гос. Дарвиновского музея*, 2007. С. 162–164.
14. *Богданов А.С., Атопкин Д.М., Челомина Г.Н.* Анализ генетической изменчивости и дифференциации малой лесной мыши *Sylvaemus uralensis* (Rodentia, Muridae) методом RAPD-PCR // *Изв. РАН. Серия биол.* 2009. № 3. С. 276–292.
15. *Стахеев В.В., Богданов А.С., Водолажский Д.И.* Уточнение видового состава лесных мышей рода *Sylvaemus* на территории Ростовской области посредством кариологического, аллозимного и молекулярно-генетического анализов // *Генетика*. 2011. Т. 47. № 5. С. 660–670.
16. *Богданов А.С.* Хромосомная дифференциация популяций малой лесной мыши *Sylvaemus uralensis* в восточной части ареала вида // *Зоол. журн.* 2001. Т. 80. № 3. С. 331–342.
17. *Богданов А.С., Розанов Ю.М.* Изменчивость размера ядерного генома у малой лесной мыши *Sylvaemus uralensis* (Rodentia, Muridae) // *Генетика*. 2005. Т. 41. № 10. С. 1369–1376.
18. *Michaux J.R., Libois R., Filippucci M.-G.* So close and so different: comparative phylogeography of two small mammal species, the Yellow-necked fieldmouse (*Apodemus flavicollis*) and the Woodmouse (*Apodemus sylvaticus*) in the Western Palearctic region // *Heredity*. 2005. V. 94. P. 52–63.
19. *Карамышева Т.В., Богданов А.С., Картавецова И.В. и др.* Сравнительный FISH-анализ С-позитивных блоков прицентромерных районов хромосом малых лесных мышей *Sylvaemus uralensis* (Rodentia, Muridae) // *Генетика*. 2010. Т. 46. № 6. С. 805–816.
20. *Челомина Г.Н., Атопкин Д.М.* Молекулярно-генетические свидетельства глубокого филогенетического разрыва между европейской и азиатской расами малой лесной мыши по данным изменчивости гена цитохрома *b* мтДНК // *Молекуляр. биология*. 2010. Т. 44. № 5. С. 792–803.
21. *Межжерин С.В.* Генетические связи и видовая принадлежность лесной мыши (Rodentia, Muridae, *Sylvaemus*) Памиро-Алая // *Изв. РАН. Серия биол.* 1996. № 1. С. 30–38.
22. *Богданов А.С., Розанов Ю.М., Якименко В.В., Малькова М.Г.* Первые сведения о зоне контакта европейской и азиатской рас малой лесной мыши *Sylvaemus uralensis* и их гибридизации в природе // *Фауна, зоогеография и экология животных: Материалы Всерос. конф. Оренбург: Изд-во ОГПУ*, 2008. С. 24–28.
23. *Балакирев А.Е., Баскевич М.И., Гмыль А.П. и др.* К вопросу о таксономическом статусе формы *ciscaucasicus* и ее родственных отношениях с малой лесной мышью *Sylvaemus uralensis* по данным секвенирования гена цитохрома *b* мтДНК // *Генетика*. 2007. Т. 43. № 12. С. 1651–1666.
24. *Ivanova N.V., Zemlak T.S., Hanner R.H., Hebert P.D.N.* Universal primer cocktails for fish DNA barcoding // *Mol. Ecology Notes*. 2007. V. 7. № 4. P. 544–548.
25. *Борисенко А.В., Иванова Н.В.* К созданию справочной базы данных ДНК-штрихкодов млекопитающих Голарктики // *Молекулярно-генетические основы сохранения биоразнообразия млекопитающих Голарктики: Материалы Междунар. конф. М.: КМК*, 2007. С. 31–40.
26. *Павлинов И.Я., Яхонтов Е.Л., Агаджанян А.К.* Млекопитающие Евразии (систематико-географический справочник). Т. 1. Rodentia. М.: Изд-во МГУ, 1995. 240 с.
27. *Рубцов Н.Б., Карамышева Т.В., Богданов А.С. и др.* Сравнительный FISH-анализ С-позитивных районов хромосом лесных мышей (Rodentia, Muridae, *Sylvaemus*) // *Генетика*. 2011. Т. 47. № 9. С. 1236–1246.
28. *Богданов А.С.* Цитогенетическое исследование лесных мышей (*Sylvaemus*, Muridae, Rodentia) Северо-Западных районов Копетдага // *Систематика и филогения грызунов и зайцеобразных. Сб. статей. М., 2000. С. 24–26.*

Genetic Variation and Differentiation of Wood Mice from the Genus *Sylvaemus* Inferred from Sequencing of the Cytochrome Oxidase Subunit 1 Gene Fragment

A. S. Bogdanov^a, V. V. Stakheev^b, A. E. Zykov^c, V. V. Yakimenko^d, and M. G. Mal'kova^d

^a*Koltsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia*
e-mail: bogdalst@yahoo.com

^b*Institute of Arid Zones, Southern Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Rostov-on-Don, 344006 Russia*

^c*Taras Shevchenko National University of Kiev, Zoological Museum, Kiev, 01601 Ukraine*

^d*Omsk Research Institute of Natural Foci Infections, Omsk, 644080 Russia*

To ascertain intra- and interspecific differentiation patterns of some *Sylvaemus* wood mice species (*S. uralensis*, *S. sylvaticus*, *S. ponticus*, *S. flavicollis*, and *S. fulvipectus*), sequence variation of the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I gene (*COI*) fragment (654 bp) was analyzed and the data obtained using several molecular genetic markers were compared. Distinct isolation of all *Sylvaemus* species (including closely related allopatric *S. flavicollis* and *S. ponticus*), as well as of the European and Asian races of pygmy wood mouse *S. uralensis* at the *COI* gene was demonstrated. However, genetic differences of the *Sylvaemus* species were 1.5 times and more higher than the distance (*D*) between the races of *S. uralensis*. This finding provides no ample grounds to treat the latter as the independent species. The only specimen of Pamir–Alay subspecies *S. uralensis pallipes* examined showed closest relatedness to the Asian race, although was rather distant from it (*D* = 0.038). No reliable isolation of the eastern European and southern European chromosomal forms, representing the European race of *S. uralensis*, as well as of their presumptive hybrids from the outskirts of the city of Sal'sk, Rostov region, at the *COI* gene was revealed. A hybrid origin of the populations of pygmy wood mouse from the outskirts of the Talapker railway station, Novovarshavsky district, Omsk region, was confirmed. In preliminary studies, based on karyotypic characters, these populations were diagnosed as distant hybrids of the eastern European chromosomal form and the Asian race. In yellow-necked wood mouse *S. flavicollis* from the territory of Russia and Ukraine, weak differentiation into northern and southern lineages (with mean genetic distance between them of 0.020) was observed. Considerably different relative genetic distances between the races of *S. uralensis* and the *S. flavicollis*–*S. ponticus* species pair, inferred from the mitochondrial cytochrome oxidase and cytochrome b gene data, indicated that the rates of evolution of different mitochondrial genome regions could be very different. It is suggested that transformations of the cytochrome b gene, or at least its part, were irregular in time and/or in different phyletic lineages (i.e., accelerated upon the formation of pygmy wood mouse races, and delayed upon the establishment of *S. flavicollis* and *S. ponticus*).