

УДК 575.:599.323.4

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭВОЛЮЦИЯ И ФИЛОГЕОГРАФИЯ ЗАПАДНОПАЛЕАРКТИЧЕСКИХ ЛЕСНЫХ МЫШЕЙ РОДА *SYLVAEMUS* ПО ДАННЫМ О ВАРИАБЕЛЬНОСТИ ГЕНОВ ЯДЕРНОЙ (IRBP) И МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ (ЦИТОХРОМ В) ДНК

© 2006 г. Г. Н. Челомина¹, Х. Сузуки²

¹Биолого-почвенный институт ДВО РАН, Владивосток 690022

e-mail: chelomina@ibss.dvo.ru

²Университет Хоккайдо, 060-08010 Саппоро, Япония

Поступила в редакцию 23.03.2004 г.

Проведен анализ особенностей молекулярной организации и эволюции 1144 пп последовательности гена цитохрома *b* мтДНК и участка гена IRBP (интерфоторецепторного ретиноид-связывающего белка) яДНК длиной 1152 пп у семи западнопалеарктических видов лесных мышей рода *Sylvaemus* (*S. sylvaticus*, *S. flavicollis*, *S. ponticus*, *S. fulvipectus*, *S. uralensis*, *S. alpicola* и *S. mystacinus*). По данным вариабельности двух белок-кодирующих последовательностей ДНК вычислены внутри-, межвидовые и межродовые генетические дистанции – абсолютные и скорректированные согласно дупараметрической опции (Kimura, 1980). Дана характеристика распределения различных типов мутационных замен (транзиции, трансверсии, гомоплазии, синонимичные и смысловые) во всех позициях кодона и для каждого гена в целом. Для каждого молекулярного маркера реконструированы фено- и филогенетические связи (UPGMA, NJ, MP и ML из пакета программ PAUP). Показана удовлетворительная устойчивость системы филогенетических связей, сконструированных разными методами для каждого молекулярного маркера. Вместе с тем, выявлены некоторые различия между молекулярными филогениями ядерного и митохондриального участков ДНК. Анализ матриархальных связей указывает на высокую вероятность монофилетичности как подрода, так и рода *Sylvaemus*, в то время как данные по ядерному гену не исключают их полифилетичности. Предлагается новая филогеографическая концепция рода западнопалеарктических лесных мышей, подразумевающая дифференциацию на территории Центральной и Малой Азии на границе миоцена и плиоцена трех основных филогенетических линий, представленных современными *S. fulvipectus*, *S. uralensis* и группой видов “*sylvaticus*” (*S. sylvaticus*, *S. flavicollis*, *S. ponticus*, *S. alpicola*), а также колонизацию ими европейского континента через различные географические области.

Семейство мышиные (Muridae) имеет два основных центра происхождения: в Юго-Восточной Азии (более древний) и в Африке. Считается, что радиация его современных представителей имела место примерно 17–19 млн. лет назад (Tong, Jaeger, 1993). Среди млекопитающих это самое большое семейство: оно включает почти треть всех видов класса Mammalia, а подсемейство Murinae – более 90% всех известных родов, распространенных, главным образом, в тропиках и субтропиках Юго-Восточной Азии, на островах Зондского архипелага, в Африке и Австралии. В Европе обнаружено только 5 родов подсемейства, одним из которых являются лесные мыши – *Sylvaemus* (Corbet, 1978; Musser, Carleton, 1993).

До недавнего времени все виды лесных мышей объединялись в единый транспалеарктический род *Apodemus* Kaup 1829, состоящий из 4 подродов: западнопалеарктических *Sylvaemus* Ognev 1924 и *Karstomys* Martino 1939 и восточнопалеарктических *Apodemus* Kaup 1829 и *Alsomys* Dukel

1929 (Musser et al., 1996). В результате широко-масштабных генетических исследований (Воронцов и др., 1989, 1992; Межжерин, Загороднюк, 1989; Межжерин, Зыков, 1991) объем рода *Sylvaemus* существенно пересмотрен и дополнен, главным образом, за счет выделения видов-двойников в восточной Европе и на Кавказе. Согласно последней таксономической ревизии, проведенной российскими зоологами, группа мышей “*apodemus*” Евразии включает несколько секций, объединяемых их явной или возможной близостью к ископаемому роду *Progonomys*. Секция “*Apodemus*” представлена двумя родами – *Apodemus* и *Sylvaemus*, занимающими (ввиду их широкой экспансии в северную Палеарктику) обособленное положение среди современных палеарктических мурид (Павлинов и др., 1995). Хотя родовой статус *Sylvaemus*, обоснованный биохимическими данными (Bonhomme et al., 1985; Межжерин, Зыков, 1991), общего признания пока не получил, мы в настоящем исследовании его принимаем.

Род *Sylvaemus* объединяет 12 видов: *S. sylvaticus* Linnaeus 1758, *S. flavicollis* Melchior 1834, *S. alpicola* Heinrich 1952, *S. uralensis* Pallas 1881, *S. fulvipectus* Ognev 1924, *S. hyrcanicus* Vorontsov, Boeskorov, Mezhzhherin 1992, *S. arianus* Blanford, 1881, *S. hermonensis* Filippucci, Simson, Nevo 1989, *S. rusiges* Miller 1913, *S. wardi* Wroughton 1908, *S. ponticus* Sviridenko 1936, принадлежащие к подроду *Sylvaemus* s. str., а также *S. mystacinus* Danford, Alston 1877, представляющий монотипический подрод *Karstomys* Martino 1939 (Павлинов и др., 1995). В настоящее время эта группа грызунов – одна из наиболее интенсивно изучаемых таксонов мелких млекопитающих. Большое число работ, выполненных с привлечением традиционных морфометрических и цитогенетических методов, продемонстрировало высокое фенотипическое и кариологическое сходство видов *Sylvaemus* (Zima, 1984; Bulatova et al., 1991; Nadjafova et al., 1993; Загороднюк, 1996; Michaux et al., 2001). Исследования методами биохимической генетики подтвердили их тесные генетические связи и позволили решить ряд таксономических проблем (Csaikl et al., 1980; Gemmeke, 1980; Britton-Davidian et al., 1991; Filippucci, 1992; Filippucci et al., 1996; Hartl et al., 1992; Межжерин, Зыков, 1991). К сожалению, все они оказались недостаточно эффективными для уточнения филогенетических связей и создания системы классификации лесных мышей. Более успешными оказались новые молекулярные методы: RFLP, RAPDs и секвенирование индивидуальных участков ядерного и митохондриального геномов (Tegelstrom, Jaarola, 1989; Suzuki et al., 1990; Челомина, 1993, 1993a, 1996, 1998; Челомина и др., 1998; Michaux et al., 1996; 1998; Bellinvia et al., 1999; Martin et al., 2000; Serizawa et al., 2000).

Начало этому направлению исследований было положено в 1975 г., когда Кук впервые провел рестрикционный анализ яДНК 4 видов лесных и полевых мышей (Cooke, 1975). Тем не менее, до сих пор филогенетические отношения лесных мышей *Sylvaemus* (равно как *Apodemus*, а также *Muridae* в целом) остаются в значительной мере невыясненными. Отчасти это связано с тем, что в каждом из исследований использовался “случайный” набор видов, и ни в одном из них род лесных мышей не был представлен в полном объеме.

В целях уточнения филогенетических связей и филогеографии западнопалеарктических лесных мышей нами проведено изучение генетического разнообразия 7 видов рода *Sylvaemus* (*S. sylvaticus*, *S. flavicollis*, *S. ponticus*, *S. fulvipectus*, *S. alpicola*, *S. uralensis*, *S. mystacinus*). Основные задачи исследования: (1) анализ особенностей молекулярной организации и эволюции гена цитохрома *b* мтДНК и гена IRBP (интерфоторецепторного ретиноидсвязывающего белка) яДНК, имеющих различные типы наследования и скорости эволюции; (2) оценка уровней дивергенции; (3) сопоставле-

ние филогенетических связей и (4) филогеографические реконструкции для видов западнопалеарктических лесных мышей по данным двух молекулярных маркеров.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования послужили 17 особей лесных мышей, представляющих западнопалеарктический род *Sylvaemus*, и полевая мышь *Apodemus agrarius* в качестве внешней группы (звездочкой отмечены данные из GenBank, в скобках указано количество секвенированных генов):

Sylvaemus sylvaticus – Украина, окрестности Киева, 2 (2); Голландия, 2* (1). *S. flavicollis* – Украина, окрестности Киева, 2 (2); Швеция, 1* (1). *S. ponticus* – Грузия, окрестности Мерги, 1 (2). *S. uralensis* – Россия, Алтайская обл., 1 (2); Молдова, окрестности Кишинева, 1 (2); Турция*, (1). *S. alpicola* – Австрия, 2* (2). *S. fulvipectus* – Грузия, окрестности Хосрова, 1 (2). *S. mystacinus* – Турция, 1* (1). *Apodemus agrarius* – Китай, Тайвань, 1* (1); Россия, Приморье, 1 (2).

ДНК получали стандартным фенольно-детергентным способом из свежих или фиксированных этанолом тканей (Sambrook et al., 1989).

ПЦР амплификацию и прямое секвенирование последовательностей ДНК выполняли как описано ранее (Suzuki et al., 2000). Первую ПЦР реакцию для амплификации 1.2 тпн участка гена цитохрома *b* мтДНК проводили с помощью универсальных праймеров L14724 и H15915 (Irwin et al., 1991), в которых номера соответствуют 3' позиции соответственно в легкой и тяжелой цепи полной последовательности мтДНК человека (Anderson et al., 1981). Вторую ПЦР-реакцию проводили, используя праймеры R-L14724 и U-H15155 (Suzuki et al., 1997). Часть экзона 1 гена IRBP яДНК амплифицировали, используя праймеры +IRBP233 и –IRBP1531 (по: Stanhope et al., 1992). Фрагмент длиной 1.2 тпн затем был амплифицирован по трем сегментам со следующими праймерами: R + IRBP335 и U-IRBP734, R + IRBP704 и U-IRBP1126, и R + IRBP1085 и U-IRBP1532 (Suzuki et al., 2000). Последовательность нуклеотидов определяли прямым секвенированием на автоматическом лазерном секвенаторе (модель 373A; ABI) с использованием набора Dye Primer Sequencing Kit (ABI).

Генетические дистанции (D) вычисляли, используя программу PAUP (Swofford, 2000), в абсолютных и относительных, скорректированных согласно двупараметрической модели Кимуры (Kimura, 1980) единицах. Фено- и филогенетические реконструкции проводили для каждого гена в отдельности с помощью невзвешенного парногруппового метода (UPGMA), метода объедине-

Таблица 1. Распределение азотистых оснований и мутационных замен (%) в двух белок-кодирующих генах лесных мышей рода *Sylvaemus*

Показатель	Ген IRBP яДНК				Ген цитохрома <i>b</i> мтДНК			
	позиции кодона				позиции кодона			
	1	2	3	1 + 2 + 3	1	2	3	1 + 2 + 3
A	20.4	26.5	14.5	20.5	30.3	20.5	44.3	31.7
G	38.6	19.4	32.6	30.0	21.5	13.2	2.1	12.2
C	28.1	24.7	37.0	30.0	24.5	23.8	31.4	26.6
T	12.9	29.3	15.8	19.4	23.7	42.4	22.0	29.4
Ts	7.7	41.2	51.1	–	15.6	2.2	82.2	–
Tv	40.0	20.0	40.0	–	4.4	0.6	95.0	–
Vs	10.0	1.4	88.6	–	23.9	30.6	45.6	–

Примечание. A, G, C, T – азотистые основания, Ts – транзиции, Tv – трансверсии, Vs – варибельные сайты.

ния ближайших соседей (NJ) (Saitou, Nei, 1987), а также максимальной парсимонии (MP) и максимального правдоподобия (ML) в программе PAUP (Swofford, 2000).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Последовательности генов ядерной и митохондриальной ДНК

Определена полная последовательность нуклеотидов для гена цитохрома *b* мтДНК и участок гена яДНК длиной 1152 пн. Полученные результаты были проанализированы совместно с опубликованными ранее данными (Serizawa et al., 2000), соответственно у 17 и 10 особей семи западнопалеарктических видов лесных мышей рода *Sylvaemus*. У всех изученных таксонов последовательность гена цитохрома *b* мтДНК начинается с консервативного метионинового кодона ATG и не содержит внутри себя стоп-кодонов, в отличие, например, от этого гена у серой крысы и некоторых полевок (Martin et al., 2000). Его длина составляет 1144 пн, как и у всех представителей Murinae, хотя у других грызунов она может быть меньше на 1 или более нуклеотидов (Lara et al., 1996; Lessa, Cook, 1998; Martin et al., 2000).

Последовательность гена IRBP яДНК начинается с аланинового кодона GCC и также не содержит внутренних стоп-кодонов. В отличие от гена цитохрома *b* мтДНК, давно являющегося общепризнанным эволюционным маркером в разных классах позвоночных, ген IRBP яДНК был впервые использован для филогенетических исследований млекопитающих всего около 10 лет назад (Stanhope et al., 1992).

Состав оснований

Состав оснований гена цитохрома *b* мтДНК проанализированных видов (табл. 1) имеет высокое сходство с таковым у других видов грызунов и млекопитающих в целом (Lara et al., 1996; Lessa, Cook, 1998; Martin et al., 2000). Насыщенность G основаниями низкая (в среднем 12.2%) по сравнению с A, T и C (31.7, 29.4 и 26.6%, соответственно). Кроме этого, частота гуанина резко различна в разных позициях кодона: в первой – 21.5%, во второй – 13.2%, в третьей – 2.1%. Вторая позиция кодона наиболее богата тиминном (42.4%), тогда как первая и третья – аденином (30.3% и 44.3%, соответственно). Для сравнения приведем данные состава оснований гена цитохрома *b* 18 видов мышевидных грызунов, включая некоторые из анализируемых нами таксонов: G = 12.8%, A, T и C – от 27.7 до 30.8%. Содержание гуанина в первом, втором и третьем положении кодона равно 22.3, 12.9 и 3.1%, соответственно (Martin et al., 2000).

Анализ состава оснований IRBP (см. табл. 1) гена выявил высокое, примерно 60%-ное, содержание G + C оснований при следующем распределении частот для каждого азотистого основания: A = 20.5%, C = 29.9%, G = 29.9% и T = 19.5%. Распределение оснований по разным позициям кодона тоже различно. Первая позиция наиболее богата гуанином (38.6%), вторая – тиминном (29.3%), а третья – гуанином (32.6%) и цитозином (37.0%). Высокое, относительно гена цитохрома *b* мтДНК, содержание G + C оснований характерно и для других белок-кодирующих генов ядерного генома. Например, последовательность гена LCAT (лецитин-холестерин-ацил-трансферазы) яДНК мышевидных грызунов содержит в среднем 53% G + C оснований. Это меньше, чем для гена IRBP, и, очевидно, связано с отсутствием выраженной диспропорции в содержании каждого из оснований (оно колеблется от 22% для аденина до 28%

Таблица 2. Генетические дистанции и отношения транзиций к трансверсиям (Ti/Tv) по данным варибельности двух белок-кодирующих генов лесных и полевых мышей

Сравниваемые таксоны	Ген IRBP яДНК			Ген цитохрома <i>b</i> мтДНК		
	Ti/Tv	K2P Ti + Tv	K2P Tv	K2P Ti + Tv	K2P Tv	Ti/Tv
Внутри видов <i>Sylvaemus</i>	9.0	0.00291 (0.000–0.0078)	0.00029 (0.000–0.0009)	0.05067 (0.0053–0.1274)	0.01036 (0.000–0.0289)	4.9
Между видами <i>Sylvaemus</i>	4.5	0.00897 (0.0035–0.0132)	0.00150 (0.000–0.0026)	0.11306 (0.0307–0.1439)	0.02116 (0.0071–0.0279)	4.6
Между видами <i>Sylvaemus</i> и <i>A. agrarius</i>	3.7	0.05266 (0.0479–0.0574)	0.00176 (0.0097–0.0115)	0.17697 (0.1609–0.1909)	0.06395 (0.0576–0.0726)	1.9
Между видами подрода <i>Sylvaemus</i> и <i>S. mystacinus</i>	–	–	–	0.17813 (0.1671–0.1898)	0.05367 (0.0665–0.0756)	1.4
Между <i>A. agrarius</i> и <i>S. mystacinus</i>	–	–	–	0.18451 (0.1842–0.1852)	0.06752 (0.0665–0.0685)	1.5

Примечание. K2P – двупараметрические дистанции Кимуры, в скобках указан диапазон изменчивости.

для цитозина) (Robinson et al., 1997). Таким образом, содержание гуанина в митохондриальном гене примерно в 2 раза ниже, чем в ядерных генах. По крайней мере, что касается гена LCAT яДНК, по мнению вышецитированных авторов, выявленные особенности в распределении нуклеотидов (т.е. повышенное G + C содержание) не имеют филогенетической значимости.

Варибельность последовательности генов

Для филогенетического анализа были использованы данные по 1140 пн участку мтДНК для 17 особей и по 1150 пн участку яДНК для 10 особей лесных мышей, представляющих соответственно 7 и 8 видов, из которых *A. agrarius* была выбрана в качестве внешней группы. Анализ соотношения количества ожидаемых и наблюдаемых изменений для каждого типа замен оснований внутри гена цитохрома *b* мтДНК показал, что оно может сильно варьировать. Если для замен A/C, A/T, C/G, G/T соотношение наблюдаемых и ожидаемых мутаций равно 1, то для замен типа A/G и C/T оно больше ожидаемого примерно в 6 и 16 раз, соответственно. Замены оснований вдоль обеих последовательностей распределены неравномерно, что характерно для большинства изученных генов в разных классах позвоночных.

В 1150 пн последовательности IRBP гена яДНК 1071 признак является инвариантным, 63 варибельных – парсимони-неинформативными и 16 – информативными. Для полной последовательности гена цитохрома *b* мтДНК выявлено 777 инвариантных признаков, 71 варибельных признаков, являющихся парсимони-неинформативными, и 292 – информативными.

Распределение замен по разным позициям кодонов в ядерных и митохондриальных последовательностях ДНК отличается крайней неравномерностью. Как и следовало ожидать (Irwin et al., 1991), третья позиция кодонов гена цитохрома *b* мтДНК оказалась более варибельной, чем первая и вторая: здесь локализовано 82.2% транзиций и 95% трансверсий (см. табл. 1). В последовательности гена IRBP яДНК в третьем положении кодона находится 51.1% транзиций и 40% трансверсий. Для митохондриального и ядерного генов по указанному объему данных доля варибельных позиций (замен оснований) в первом положении кодона составляет 10 и 23.9%, втором – 1.4 и 30.6%, а третьем – 88.6 и 45.6%, соответственно. Хотя в обоих случаях самыми изменчивыми и дающими больший филогенетический сигнал являются третьи позиции кодонов, наименее изменчива у митохондриального гена 2 позиция кодона, а у ядерного – первая. Средние отношения Ts/Tv (транзиций/трансверсий) равны 4.5 и 5.6, соответственно для ядерного и митохондриального генов при сравнении видов, принадлежащих подроду *Sylvaemus*. Для межподродовых и межродовых сравнений эти значения существенно ниже (1.4–1.9) (табл. 2). Полученные данные вполне сопоставимы с результатами других авторов, исследовавших молекулярные особенности филогении и эволюции как млекопитающих, включая лесных мышей, так и других животных (Saitou, Nei, 1987; Martin et al., 2000; Шедько, 2002).

Последовательности гена IRBP яДНК, в отличие от гена цитохрома *b* мтДНК, внутри себя содержат полиморфные сайты. У некоторых особей число полиморфных сайтов особенно велико. Например, в геноме одной из мышей вида *S. sylvaticus* их 7, а *S. ponticus* – 6. Аналогичная ситуа-

Таблица 3. Число гомоплазий в последовательностях гена IRBP яДНК (над диагональю) и гена цитохрома *b* мтДНК (под диагональю) лесных мышей

№	Вид	1	2	3	4	5	6	7	8
1	<i>A. agrarius</i>	–	0	0	0	0	0	4	–
2	<i>S. ponticus</i>	187	–	0	0	2	0	0	–
3	<i>S. fulvipectus</i>	165	44	–	0	2	0	4	–
4	<i>S. flavicollis</i>	177	0–2	34	–	2	0	0	–
5	<i>S. uralensis</i>	180	18–24	48–56	12–22	–	2	6	–
6	<i>S. alpicola</i>	176	6–10	42–50	6–8	6–16	–	2	–
7	<i>S. sylvaticus</i>	185	14–34	26–46	14–24	0–34	6–8	–	–
8	<i>S. mystacinus</i>	185	182	181	176	177	177	178	185

ция наблюдалась при изучении гена IRBP яДНК у японской лесной мыши и японской сони (Serizawa et al., 2000). Наиболее вероятно, что данный тип полиморфизма обязан своим существованием аллельным вариантам, поскольку число типов для каждого гетерозиготного сайта не превышает двух, а мутации представлены, главным образом, синонимичными транзиторными заменами в третьем положении кодона. Конечно, как это отмечалось ранее (Serizawa et al., 2000), нельзя полностью исключить возможности присутствия псевдогенов, мультикопий данного гена или наличия артефактов. Так, например, Мишо с соавт. (Michaux et al., 2002) полагают, что в работе Мартина с коллегами (Martin et al., 2000) был использован в качестве последовательности гена цитохрома *b* мтДНК, вероятнее всего, ядерный псевдоген. Заманчивым, с нашей точки зрения, представляется объяснение этого явления межвидовой гибридизацией (периодически дискутируемой в связи с запутанностью систематики лесных мышей) как первопричины внутригеномного полиморфизма. Действительно, для митохондриального генома при скрещивании млекопитающих известны примеры замещения одного гаплотипа другим всего за несколько генераций, причем на переходной стадии геном митохондрий обладает гетероплазмичностью, т.е. содержит разные варианты гаплотипов мтДНК (Hauswirth, Laipis, 1985).

Генетические дистанции

Для исследованной группы мышей вычислены попарно абсолютные (*p*, суммарные и отдельно для замен типа трансверсий и транзиций) и относительные генетические дистанции, скорректированные согласно двухпараметрической модели Кимуры (Kimura, 1980), а также гомоплазии (табл. 2, 3). Внутри подрода *Sylvaemus* относительные межвидовые генетические дистанции Кимуры составляют в среднем 0.113 (от 0.030 до 0.144) и 0.009 (от 0.004 до 0.013), соответственно для гена цитохрома *b* мтДНК и гена IRBP яДНК.

Для обоих генов эти значения становятся значительно ниже при внутривидовых сравнениях и существенно выше – при сравнении видов подрода *Sylvaemus* с *S. mystacinus* (подрод *Karstomys*) или *A. agrarius* (род *Apodemus*), причем межродовые и межподродовые дистанции оказываются практически равными.

Самыми близкими видами, согласно данным секвенирования гена цитохрома *b* мтДНК и участка гена IRBP яДНК, являются *S. flavicollis* и *S. ponticus*, а самым далеким видом в подрode *Sylvaemus* – *S. fulvipectus*. Горная малоазийская мышь, *S. mystacinus*, отличается от видов подрода *Sylvaemus* на уровне внешней группы во всех (Martin et al., 2000; Michaux et al., 2002) исследованиях, включая наши. Сравнение этих результатов с имеющимися данными свидетельствует о том, что в каждой конкретной работе по филогенетической близости определяются разные пары видов, но все они включают *S. alpicola*: *S. alpicola* и *S. uralensis* (Michaux et al., 2002), *S. alpicola* и *S. sylvaticus* (Martin et al., 2000), *S. alpicola* и *S. flavicollis* (Serizawa et al., 2000). Мы считаем это закономерным, потому что разные исследовательские группы анализировали различные наборы видов и пользовались разными модификациями статистических программ при обработке оригинальных данных. Более того, ни в одну из цитированных работ не были включены ни *S. ponticus*, ни *S. fulvipectus*.

Как известно, по первому из маркеров (гену цитохрома *b* мтДНК) генетические дистанции внутри различных родов грызунов могут быть велики и варьировать в широком диапазоне. Например, у кавиоморфных грызунов генетические дистанции достигают 9–20% (Lara et al., 1996), у мышевидных – 6–15% (Martin et al., 2000). Таким образом, верхние пределы внутривидовых генетических дистанций достигают нижних пределов межродовой дивергенции, которая составляет в среднем 15.5% для родов Murinae (Martin et al., 2000) и 21% – для кавиоморфных грызунов (Lara et al., 1996). Согласно ранее опубликованным дан-

ным, дивергенция генов цитохрома *b* мтДНК и гена IRBP яДНК между видами рода *Sylvaemus*, *Apodemus*, а также между родами Murinae составляет (дистанции скорректированы согласно двухпараметрической модели Кимуры) соответственно 0.112, 0.167, 0.174 и 0.010, 0.040, 0.047 по всем типам замен или 0.022, 0.046, 0.060 и 0.010, 0.040, 0.047 – с учетом только трансверсий (Serizawa et al., 2000). По другим источникам, они равны (при исключении транзиций в третьей позиции кодона гена цитохрома *b*) соответственно 4.0%, 6.8% и 10.6% для гена цитохрома *b* мтДНК, и 1.3%, 3.8% и 7.2% – для гена IRBP яДНК (Michaux et al., 2002). Таким образом, опубликованные результаты вполне сопоставимы не только между собой, но и с полученными нами данными.

Теоретически весьма сомнительно, что исключение транзиций (даже только в третьей позиции кодона) следует считать оправданным при филогенетических исследованиях данной группы грызунов. Известно, что скорость эволюции митохондриальных генов в среднем на порядок выше, чем ядерной. Именно такое соотношение мы наблюдаем при вычислении генетических дистанций лесных мышей по данным изменчивости последовательностей ядерного и митохондриального генов. Это касается как собственной работы, так и исследований других авторов, учитывающих при определении генетических дистанций все типы замен во всех положениях кодона. Однако соотношение нарушается при сравнении таксонов, расположенных на иерархической лестнице более высоко. Но исключение транзиций не исправляет положения, а лишь снижает (хотя и неравномерно) общий уровень значений генетических дистанций. В таком случае, действительно, соотношение уровней межвидовой и межродовой дивергенции более показательно. Учитывая, что основная задача исследования – межвидовые отношения в пределах подрода, есть все основания для использования полного объема полученных нами данных. Эти рассуждения находят подтверждение в результатах анализа насыщения нуклеотидных замен в разных позициях кодона.

Анализ насыщения нуклеотидных замен

Для определения уровней насыщения транзиций и трансверсий были построены графики зависимости между количеством мутационных замен и нескорректированными генетическими дистанциями (рис. 1). Анализ указанной зависимости выявляет отсутствие насыщения не только трансверсий (Tv), но и транзиций (Ts) во всех позициях кодона гена IRBP яДНК. Слабое насыщение замен в третьей позиции кодона этого гена отмечается при сравнении таксонов мышевидных грызунов более высокого таксономического ранга (Michaux et al., 2002). Уровень гомоплазии низок

во всех положениях кодона (см. табл. 3). Поэтому для филогенетических построений были учтены все эволюционные события (т.е. оба типа замены оснований).

Для гена цитохрома *b* мтДНК Ts и Tv в третьем положении кодона близки к насыщению, уровень гомоплазии выше, чем для гена яДНК (см. табл. 3). Эта картина вполне соответствует представлениям о характере замен в быстро эволюционирующих последовательностях ДНК. Однако относительная насыщенность даже наиболее варибельной третьей позиции кодона транзициями, трансверсиями и гомоплазиями характерна только для внешней группы. Более того, именно в третьей позиции кодона локализовано большинство филогенетически информативных сайтов: 82.2% (240 из 292). Поэтому филогенетические реконструкции матриархальных связей мы также проводили по базе данных, учитывающей все замены во всех позициях кодона.

Время дивергенции таксонов

Время дивергенции разных таксонов устанавливали по данным дифференциации гаплотипов гена цитохрома *b* мтДНК, эволюционирующего, в отличие от других генов митохондриального генома, примерно с равными скоростями в различных родах Murinae (Robinson et al., 1998). Из палеонтологических данных в качестве калибровочной выбрана точка расхождения *S. mystacinus* (подрод *Karstomys*) с остальными видами рода *Sylvaemus*, насчитывающая примерно 7 млн. лет (Michaux et al., 1997). Основываясь на этих данных, а также на полученных нами оценках дивергенции *S. mystacinus* с видами подрода *Sylvaemus* (см. табл. 2), мы находим, что молекулярная эволюция у лесных мышей шла со скоростью 2.54% дивергенции за 1 млн. лет. Это полностью соответствует оценке молекулярных часов для мтДНК млекопитающих: примерно 2.5% дивергенции нуклеотидов за 1 млн. лет (Brown, 1989; Irwin et al., 1991). Таким образом, из наших данных следует, что видообразование внутри подрода *Sylvaemus* происходило в период 1.2–5.7 млн. лет назад, т.е. в плиоцене-плейстоцене, а его дивергенция с родом *Apodemus* произошла более 7.5 млн. лет назад, т.е. еще в миоцене. Эти данные уточняют палеонтологические сведения, которые датируют становление западнопалеарктического рода лесных мышей плейстоценом (Громов и др., 1963). Действительно, если находки современных видов рода *Sylvaemus* датируются ранним плейстоценом, их дивергенция должна была начаться раньше – в плиоцене. Аналогичные оценки эволюционного возраста рода *Sylvaemus* были получены нами ранее (Челомина и др., 1998; Serizawa et al., 2000) и подтверждены в ряде других исследований (Martin et al., 2000; Michaux et al., 2002).

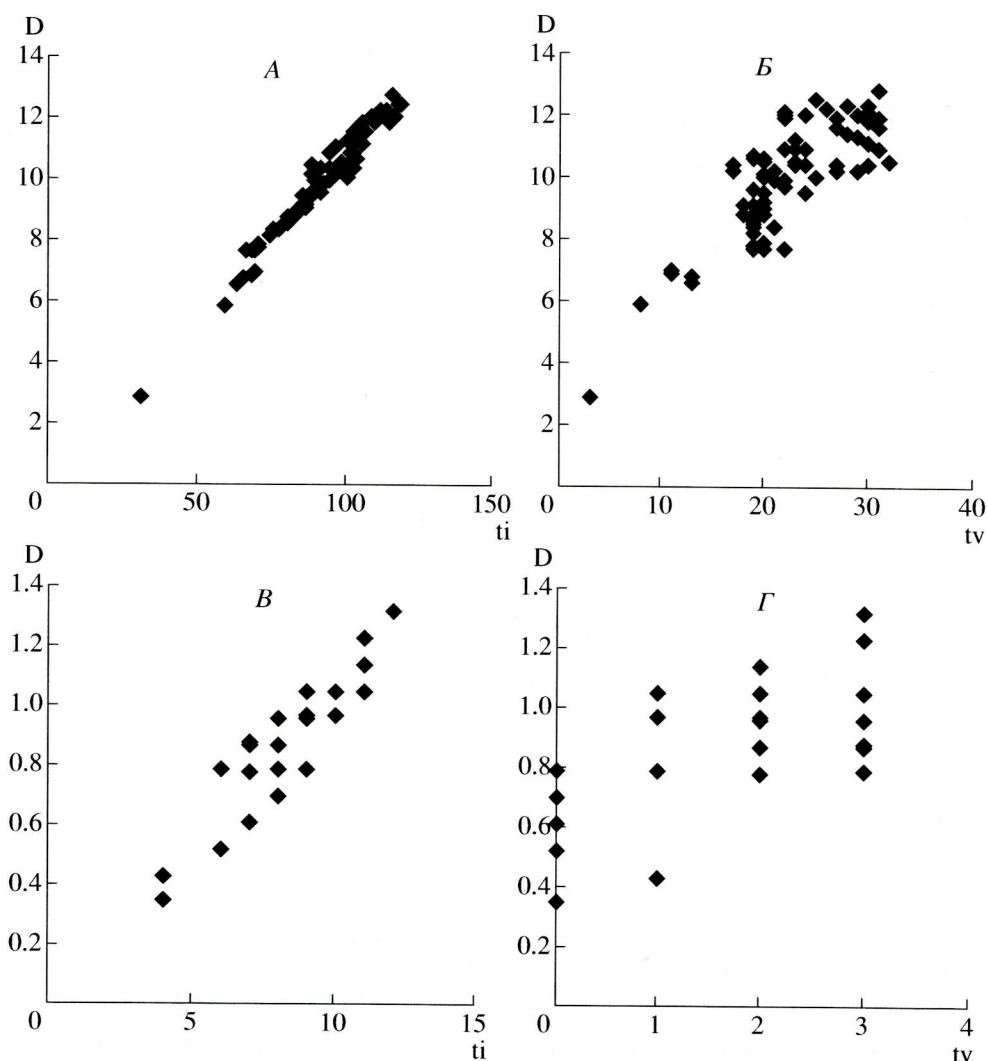


Рис. 1. Насыщение транзиционными (А, В) и трансверсионными (Б, Г) заменами гена цитохрома *b* мтДНК (А, Б) и участка гена IRBP яДНК (В, Г) лесных мышей (по оси абсцисс – количество замен, по оси ординат – межвидовые генетические дистанции).

Что касается самых молодых видов лесных мышей (возможно, радиировавших от *S. sylvaticus*), они, вероятнее всего, действительно имеют плейстоценовое происхождение. Наши рассуждения согласуются с выводами исследований особенностей генетико-биохимической дифференциации и биостратиграфии о том, что для лесных мышей средний плейстоцен является пиком видообразования, а граница плиоцена–миоцена – родообразования (Межжерин, 1997).

Филогенетический анализ

Различные скорости эволюции генов (равно как и отдельных генных участков) имеют особое значение для филогенетических реконструкций. В идеальном варианте различия в скоростях эволюции внутри и между генными участками долж-

ны быть отражены в филогенетических взвешивающих схемах. Такие схемы дают больший вес относительно консервативным сайтам и типам замен, которые имеют меньшую частоту, таким образом придавая особое значение сайтам и изменениям, имеющим меньшую вероятность гомоплазии (Johnson, Sorenson, 1998). Поэтому чтобы определить, какая эволюционная модель более всего подходит для наших данных, была использована программа Modeltest 3.04 (Posada, Crandall, 1998) с тестами двух статистических значений и коэффициентом правдоподобия (LRT), а также с информационным критерием Акейки (AIC; Akaike, 1974). По результатам тестирования для данных по секвенированию гена цитохрома *b* мтДНК была выбрана модель Тамуры–Нея (TrN; Tamura, Nei, 1993) с пропорцией инвариабельных сайтов (I) и параметром гамма фигуры (G) для

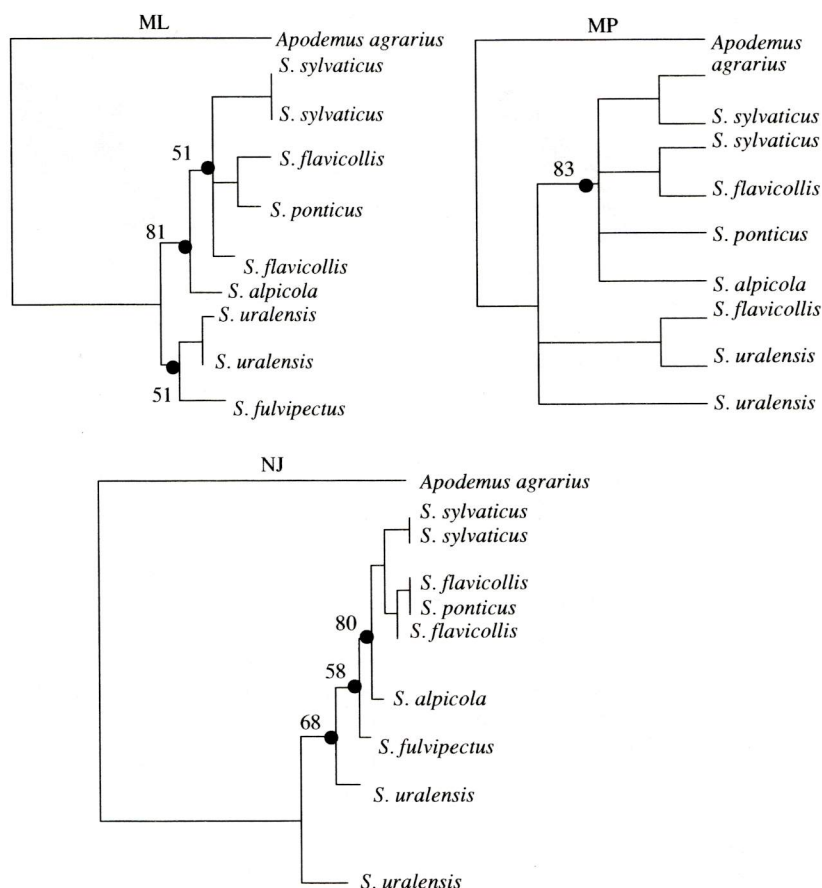


Рис. 2. Филогенетические связи лесных мышей рода *Sylvaemus* по данным последовательности гена IRBP яДНК (бутстреп-значения выше 50 указаны в узлах ветвления древ; ML, MP, NJ – см. в тексте).

скорости изменения среди сайтов, вычисленных по набору данных (TrN + I+G; частота оснований и параметры замен были установлены с помощью Modeltest 3.04 (Posada, Crandall, 1998)). Для гена IRBP яДНК тестированием выбрана более простая модель: HKY + G (без учета пропорции инвариантных сайтов – I).

Филогенетические деревья были построены с использованием методов максимальной парсимонии (maximum-parsimony – MP), объединения ближайших соседей (neighbor-joining – NJ) и максимального правдоподобия (maximum-likelihood – ML). Сила филогенетического сигнала в наборе данных была оценена по длине распределения случайных древ, а достоверность узлов ветвления – по значениям бутстрепа в рамках 1000 (NJ) или 100 (MP, ML) репликаций (Felsenstein, 1985). Различные подходы продуцировали деревья с разной топологией для каждого молекулярного маркера, но для каждого маркера разные типы древ не имели принципиальных отличий.

Древа (NJ, MP, ML), построенные по данным секвенирования гена IRBP яДНК, имеют небольшую длину ($L = 89$), относительно высокие индек-

сы соответствия (consistency index $CI = 0.8876$) и устойчивости (retention index $RI = 0.6667$), и низкий – гомоплазии ($HI = 0.1124$). Однако они не дают поддержки монофилетичности лесных мышей, демонстрируя политомию, т.е. практически одновременное отделение трех эволюционных ветвей: двух монотипических с *S. fulvipectus* и *S. uralensis*, а также политипической, объединяющей четыре эволюционно более молодых вида, – *S. sylvaticus*, *S. alpicola*, *S. flavicollis* и *S. ponticus* (рис. 2). Клада из последних двух таксонов представляет особый интерес, так как объединение *S. ponticus* с одним из генотипов *S. flavicollis* имеет вероятность, оцененную бутстреп анализом, в 54–71%, в то время как монофилетичность всей клады *S. flavicollis* + *S. ponticus* не превышает 52% поддержку (табл. 4). Это может быть свидетельством либо парафилетичности, либо гибридного формообразования таксонов. Важно, что все реконструкции указывают на достоверную дифференциацию *S. fulvipectus* и *S. uralensis* (имеющих азиатский тип “притяжения”) с остальными (“чисто” европейскими) видами рода, имеющими высокую бутстреп-поддержку (80–83%) их монофилетичности. В то же время для объединения

Таблица 4. Бутстреп-значения в основных узлах ветвления филогенетических древ, выведенных по данным вариабельности двух белок-кодирующих генов лесных мышей

Ген IRBP яДНК				Ген цитохрома <i>b</i> мтДНК			
узлы ветвления	MP	NJ	ML	узлы ветвления	MP	NJ	ML
Подрод <i>Sylvaemus</i>	≤50	≤50	≤50	Род <i>Sylvaemus</i>	100	100	100
syl + flv + pnt + alp	83	80	81	подрод <i>Sylvaemus</i>	97	98	99
flv + pnt	52	≤50	≤50	syl + flv + pnt + alp + url	85	93	68
url + ful	≤50	≤50	51	flv + pnt + alp + url	62	54	55
url	76	≤50	74	flv + pnt	95	98	98
slv	97	57	96	url	100	100	100
				slv	≤50	≤50	≤50
				flv	100	100	100
				alp	100	100	100

Примечание. syl – *S. sylvaticus*, flv – *S. flavicollis*, pnt – *S. ponticus*, alp – *S. alpicola*, url – *S. uralensis*, ful – *S. fulvipectus*.

S. fulvipectus с *S. uralensis* такая поддержка отсутствует, их с большим основанием можно считать парафилетичными. Таким образом, филогения ядерного гена указывает на существование трех дивергентных линий – восточной с *S. uralensis*, южной с *S. fulvipectus* и западной группой “sylvaticus”, представленной 4 видами: *S. sylvaticus*, *S. flavicollis*, *S. ponticus* и *S. alpicola*.

Остановимся более подробно на некоторых важных моментах молекулярной филогении локусов яДНК. Эти локусы дают нам уникальную возможность для восстановления некоторых эпизодов в эволюционной истории таксонов в фазе их становления, которые могут быть “стерты” в быстро эволюционирующих последовательностях мтДНК. 1. У многих таксонов более низкая скорость замен в яДНК минимизирует возвратные и параллельные мутации, которые снижают филогенетическое разрешение. Таким образом, в данных с низкой гомоплазией даже одиночные фиксированные отличия могут обеспечить статистически верный результат, поддержанный бутстрепом. Наши данные изменчивости IRBP гена яДНК этому критерию полностью отвечают. 2. Для получения адекватного набора филогенетически информативных признаков анализируемые последовательности ядерного генома должны быть как можно длиннее. Как отмечалось (Hare, 2001), теоретически в двуполой популяции, где участие в размножении самок и самцов одинаково, эффективный размер аутосомных ядерных локусов должен быть в 4 раза меньше, чем митохондриальных. В этом плане наши данные имеют некоторые ограничения, желательно было бы увеличение анализируемого участка по крайней мере в 4 раза. 3. Для получения достоверной информации о монофилии ядерных локусов по данным мтДНК было предложено правило трехкратного времени (three-times rule), выведенное из

теоретически предполагаемого четырехразового различия (см. выше) среднего времени монофилии ядерных и митохондриальных локусов (Hare, 2001). Согласно этому правилу, длина филогенетических ветвей, соединяющих сестринские клады, является временным показателем монофилии мтДНК. Когда отношение дивергенции внутри клад значительно больше или меньше, чем 3 : 1, модель, соответственно, либо не поддерживает, либо, напротив, поддерживает монофилию ядерных маркеров. Этот тест применительно к нашим данным свидетельствует в пользу полифилетичности гена IRBP яДНК лесных мышей. 4. Полифилетичность лесных мышей, предполагаемая на основании наших данных, теоретически не вполне ожидаема. Популяции или виды, которые дивергировали в плейстоцене, в большинстве случаев, действительно, должны занимать смешанно-монофилетическую зону дивергенции, где мтДНК имеет большую возможность монофилии, но ядерный локус в среднем полифилетичен (Hare, 2001).

Эволюционный возраст западнопалеарктических мышей свидетельствует об их плиоценовом происхождении. Этого времени должно быть достаточно для приобретения монофилии большинства ядерных локусов. Что же в таком случае может быть причиной “ложной” полифилии лесных мышей? Есть как минимум два объяснения: наличие в эволюционной истории событий межвидовой гибридизации и отсутствие среди анализируемых таксонов (по ядерным локусам) вида, отвечающего всем необходимым требованиям для внешней группы. Наконец, IRBP ген может быть неэффективным для изучения филогенетических связей близкородственных видов.

Эволюционные древа (NJ, MP, ML), построенные по данным изменчивости гена цитохрома *b* мтДНК, разрешают систему связей внутри рода

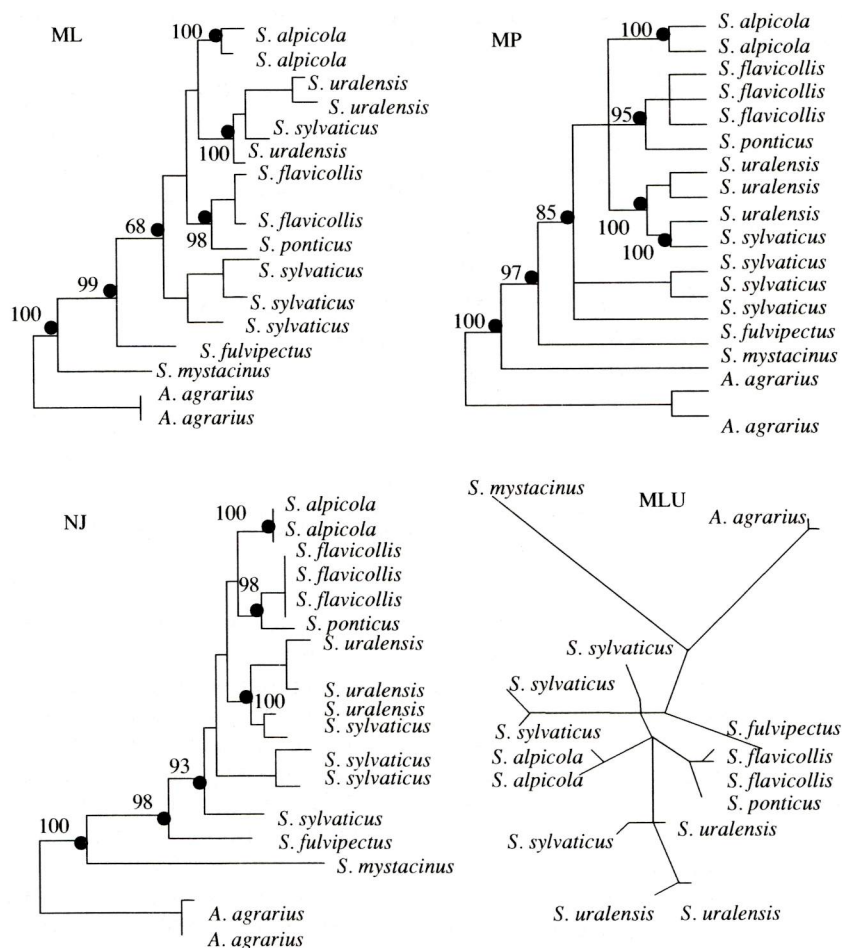


Рис. 3. Филогенетические связи лесных мышей рода *Sylvaemus* по данным последовательности гена цитохрома b мтДНК (высокие бутстреп-значения указаны в узлах ветвления древ; ML, MP, NJ – см. в тексте).

Sylvaemus иначе (рис. 3). Они имеют большую длину – $L = 842$ (по крайней мере, отчасти оправданную увеличением числа сравниваемых таксонов с 10 по ядерным локусам до 17), меньший индекс постоянства ($CI = 0.5558$), больший – гомоплазии ($HI = 0.4442$), но почти такой же, как для гена IRBP яДНК, индекс устойчивости ($RI = 0.6293$). Исключение третьей позиции кодона из анализа данных не оказывает существенного влияния на значения перечисленных индексов. Бутстреп-анализ полученных древ указывает на высокую вероятность монофилетичности как подрода, так и рода *Sylvaemus*. Все реконструкции обнаруживают сильную дивергенцию *S. mystacinus* с видами подрода *Sylvaemus*.

Аналогично реконструкциям для ядерного гена, наиболее близкими по мтДНК являются *S. ponticus* и *S. flavicollis*, а наиболее дифференцированным видом – *S. fulvipectus*. Обращает внимание положение гаплотипов мтДНК *S. sylvaticus*: они могут представлять несколько филогенетических линий, в том числе “предковую” для всей группы “*sylvaticus*”. Более того, один из гаплоти-

пов *S. sylvaticus* занимает положение внутри субкластера *S. uralensis*. Большая близость между мтДНК разных видов по сравнению с таковой для конспецифичных особей известна в литературе как феномен межвидового переноса последовательностей ДНК. Например, у полевок известен случай, когда несоответствие генетической и таксономической дифференциации объясняется межвидовым переносом мтДНК, которое произошло по причине естественной гибридизации между красной (*Clethrionomys rutilus*) и красно-серой (*C. rufocanus*) полевыми. В результате межвидовые генетические дистанции оказались на порядок ниже: 1.3% по сравнению с 13.5% для этих видов из других популяций (Tegelstrom, 1987). Один из гаплотипов мтДНК бурого медведя оказался значительно ближе к гаплотипу белого медведя, чем к гаплотипам своего вида. Эту ситуацию авторы объясняют парафилетичным происхождением таксонов (Crainhead et al., 1995). Случаи интрогрессии (одно- или двунаправленной) обнаружены также при анализе географической изменчивости мтДНК разных видов лососей Salmoninae (Glemet

et al., 1998; Wilson, Bernatchez, 1998). Как правило, проникновение в чужой генофонд генов мтДНК происходит более интенсивно, чем ядерных, причем чужой клон может не только закрепиться, но и полностью вытеснить клоны мтДНК вида-реципиента (Avisé et al., 1984).

Высокий генетический полиморфизм европейской лесной мыши, *S. sylvaticus*, проявляется также на хромосомном уровне. Для нее выделяют до 5 цитотипов по характеру распределения гетерохроматинового материала и 3 – по числу ЯОР (район ядрышковых организаторов) хромосом (Картавцева, 2002). Другие авторы признают дифференциацию этого вида на две хромосомные формы, отличающиеся содержанием и локализацией гетерохроматиновых сегментов и ЯОР (Hirning et al., 1989; Богданов, 2002) и даже предлагают выделение их в самостоятельные виды (Орлов и др., 1996). По количественному содержанию гетерохроматина и локализации ЯОР в кариотипах малой лесной мыши – *S. uralensis* некоторые авторы выделяют как минимум 4 цитотипа (Картавцева, 2002), другие признают 3 расы с разным количеством прицентромерного гетерохроматина (Богданов, 2001, 2002), причем, по крайней мере, двум из них предлагается повысить таксономический ранг до видового уровня (Орлов и др., 1996). Другие виды подрода *Sylvaemus* менее полиморфны по этим критериям. У *S. flavicollis* и *S. ponticus* выделено по два цитотипа, отличающихся только по ЯОР (Картавцева, 2002). Наши данные филогенетических реконструкций матриархальных связей указывают на высокую изменчивость *S. sylvaticus* и не исключают полифилетическое происхождение. В отличие от данного вида, все остальные представители подрода имеют высокие (95–100%) бутстреп-значения монофилетичности. Тем не менее, мало вероятно (54–62%), что эта подгруппа (за исключением эволюционно наиболее “старых” *S. fulvipectus* и *S. sylvaticus*) может считаться монофилетичной.

График сравнения генетических дистанций, вычисленных по данным варибельности двух маркеров, наглядно показывает, что изменения в ходе молекулярной эволюции гена IRBP яДНК и гена цитохрома *b* мтДНК слабо коррелированы (рис. 4). Некоторое несоответствие молекулярных филогений лесных мышей по данным ядерного и митохондриального маркеров продемонстрировано нами ранее при сравнении данных ПДРФ суммарной яДНК и изменчивости 402 пн участка гена цитохрома *b* мтДНК (Челомина и др., 1998; Serizawa et al., 2000). Различия в филогениях, основанных на данных разных молекулярных маркеров лесных мышей подрода *Sylvaemus*, были обнаружены также при исследовании участка гена цитохрома *b* мтДНК и регионов, фланкирующих микросателлитные последовательности (Makova et al., 2000).

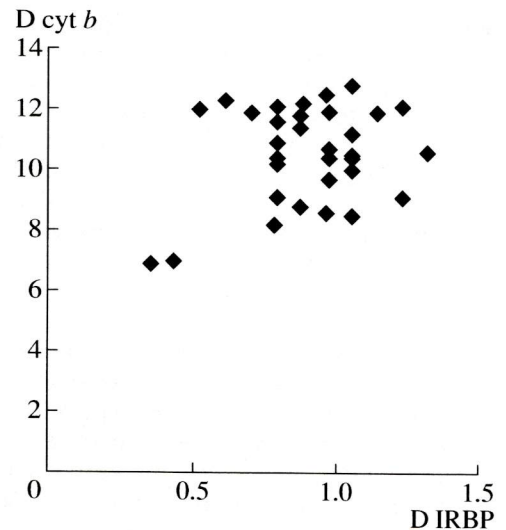


Рис. 4. Зависимость между генетическими дистанциями, вычисленными по данным варибельности ядерного (IRBP, ось абсцисс) и митохондриального (цитохром *b*, ось ординат) генов у видов *Sylvaemus*.

Таким образом, анализ топологий молекулярных деревьев, построенных по данным изменчивости ядерных и митохондриальных генов, приводит нас к заключению о реальности полифилетического происхождения и гибридогенного формообразования в группе видов транспалеарктического рода лесных мышей *Sylvaemus*, а также о монофилии митохондриальных локусов современных видов и их относительно независимой (по крайней мере, отличной) от ядра эволюционной истории. Данные позволяют условно разделить подрод *Sylvaemus* на три группы, согласно особенностям (предполагаемым на основании имеющихся данных) их происхождения: 1 – *S. fulvipectus*, тип 1 яДНК + тип 1 мтДНК; 2 – *S. uralensis* тип 2 яДНК + тип 2 мтДНК; 3 – группа видов “*sylvaticus*”, тип 3 яДНК + тип 2 мтДНК.

Еще одна сторона проблемы филогенеза – это концептуальный вопрос о характере отделения от общего филогенетического ствола видов, т.е. о реальности последовательного и одновременного ответвления таксонов, дающих филогенетические реконструкции соответственно в виде деревьев и кустов. Характер топологий филогенетических реконструкций и уровень бутстреп-значений в точках ветвления филумов вполне допускают существование в эволюционной истории сравниваемых таксонов чередование двух основных эволюционных событий, когда практически одновременно возникает сначала группа одних видов, каждый из которых в результате последовательной дивергенции дает начало другим новым видам.

Как мы уже отмечали, ни в одной из известных нам работ, выполненных методами молекулярной генетики, род *Sylvaemus* не был представлен в

полном объеме. Отчасти по этой причине, а также в зависимости от выбранной филогенетической программы, топологии всех филогенетических реконструкций в большей или в меньшей мере отличаются друг от друга, хотя некоторые из предлагаемых реконструкций характеризуются высокими значениями бутстреп-поддержки в узлах ветвления филумов. Очевидно, проблема филогенетических связей лесных мышей не решается корректно без привлечения максимально полного объема данных, причем не только по видовому, но и по внутривидовому разнообразию. Например, полифилия *S. sylvaticus* может быть подтверждена, а недавняя интрогрессия между *S. sylvaticus* и *S. uralensis* – отвергнута, если идентичные гаплотипы будут обнаружены в разных частях ареалов этих таксонов. Таким образом, мы разделяем мнение авторов (Громов, Ербаева, 1995; Musser et al., 1996), считающих, что широкие таксономические обобщения пока либо преждевременны, либо малоубедительны из-за отсутствия одномасштабного генетического анализа и детального изучения лесных мышей по всему ареалу. И прежде всего, это замечание справедливо в отношении видов рода *Sylvaemus*.

Эволюционная история и филогеографические реконструкции

Практика показывает, что молекулярным маркером первостепенной важности в филогеографических исследованиях продолжает оставаться мтДНК. Молекулярные маркеры яДНК привлекаются часто для подкрепления выводов, полученных с помощью митохондриальных маркеров. Для корректной интерпретации, особенно данных по полифилетическим генным локусам, наиболее эффективным аналитическим подходом являются такие тестирования исторических моделей, как максимальная парсимония MP и максимальное правдоподобие ML.

Не имея принципиальных возражений касательно математического аппарата (достаточно мощного, несмотря на то, что практически любой алгоритм множества теоретических моделей имеет как сильные, так и слабые стороны), мы все же позволим себе не согласиться с концептуальной расстановкой акцентов относительно ядерного и митохондриального локусов. Во-первых, алогично подкреплять результаты филогении видов быстро эволюционирующего маркера (мтДНК) данными, полученными с помощью менее вариабельных участков (яДНК). Скорее всего, следует поступить наоборот, тем более, что в силу своей относительной консервативности именно ядерные локусы способны дать более достоверную информацию о ранних событиях в эволюции таксонов, имеющих ранг “хороших” самостоятельных видов. Во-вторых, ядерные и митохондриаль-

ные филогении по определению могут быть различны и даже иметь собственную эволюционную историю (прежде всего, в силу различий в типе наследования). Поэтому есть основания сомневаться в целесообразности их объединения в рамках единой филогенетической концепции (т.е. построения консенсусного древа). В третьих, следует помнить, что “завоевание” (колонизация) мелкими грызунами новых территорий, прежде всего, связано с самцами, как правило, имеющими большую по сравнению с самками активность и способность к расселению. Роль самок (а следовательно, и их след в эволюционной истории) усиливается при резких демографических колебаниях (включая эффект основателя). Поэтому для разработки собственной филогеографической концепции мы будем опираться на филогению гена яДНК и детализировать ее, используя данные о матриархальных связях.

Палеарктика открывает особые возможности для молекулярно-генетических и филогеографических исследований. Однако палеонтологические данные по палеарктическим представителям семейства мышинных (в отличие, например, от таковых для подсемейства полевковых) довольно скудны. Результаты генетико-биохимических исследований предполагают два центра происхождения видов данного семейства: Юго-Восточная Азия и Африка (Межжерин, 1997). Первая волна миграции предков современных западнопалеарктических лесных мышей рода *Sylvaemus* датируется нами миоценом. Этот период характеризуется существенными климатическими переломами, которые привели к радикальным изменениям растительности на всей планете (Michaux et al., 2002). Согласно Церлингу с коллегами (Cerling et al., 1997), Европа (по сравнению с Азией, где происходили наиболее драматические события) была более защищена от климатических изменений и (поэтому) оставалась покрытой лесами, играющими важную роль в видообразовании и эволюции лесных мышей. Считается, что предок *S. mystacinus* (*A. primaevus*) присутствовал в Европе с миоцена, но истинная *S. mystacinus* появилась только в среднем плиоцене. За этот период виды широко распространились, хотя имели низкую плотность населения из-за конкуренции с другими грызунами того времени. В плиоцене или раннем плейстоцене похолодание привело к изоляции двух групп: балканской и ближневосточной (Турция, Израиль), где позже сформировались *S. mystacinus* и *S. epimelas* (Borisova, 1993; Michaux et al., 2002).

Радиация видов подрода *Sylvaemus*, по нашим данным, имела место на границе миоцена и плиоцена. В этот период в Палеарктике климат был то субтропическим с теплой и сырой погодой, то холодным и сухим. Затем, примерно 3.1 млн. лет назад, произошло первое ледниковое похолода-

ние четвертичного периода. В результате растительность изменилась от преимущественно лесной до степной и лесостепной (Borisova, 1993; Fauquette et al., 1998, 1999; Michaux et al., 2002). Именно в этот период могли сформироваться три филогенетические линии подрода *Sylvaemus*, давшие впоследствии *S. fulvipectus*, *S. uralensis* и группу видов "sylvaticus" (*S. sylvaticus*, *S. flavicollis*, *S. ponticus* и *S. alpicola*). Мы не знаем точно, где это происходило, но, судя по особенностям современных видовых ареалов и некоторым сведениям из области генетики, скорее всего, это была Центральная и/или Малая Азия. Впервые на такую возможность указали Воронцов с соавт. (1989).

Заселение восточной и западной Европы видами подрода *Sylvaemus* происходило предположительно несколькими путями. Предок *S. fulvipectus* первым оккупировал территорию Закавказья и прилегающую к нему часть средней Азии, продвигаясь, очевидно, в северо-западном направлении с Юго-Востока Азии. Колонизация западной Европы предками *S. sylvaticus* (которые, вероятно, либо не могли успешно конкурировать с горной малоазиатской мышью, *S. mystacinus*, и другими видами грызунов и мелких млекопитающих, либо пути расселения определяли экологические и климатические особенности) проходило по самому южному пути, через север Аравийского полуострова и Африки. Это вполне реально, так как в первой половине плиоцена фаунистический облик Юго-Восточной Азии, Индии и Африки был практически идентичным. Предок современной *S. flavicollis* успешно (но, видимо, относительно медленно из-за естественных географических преград) преодолел Кавказские горы, оставив после себя *S. ponticus* (эволюционные истории этих таксонов, как мы видели выше, тесно связаны) и стал заселять центральную Европу. Действительно, начиная с плейстоцена *S. sylvaticus* присутствовала только в Испании и южной Франции, в то время как ареал *S. flavicollis* охватывал центральную Европу (Michaux et al., 2002). Наконец, с востока Европа заселялась формой, породившей современный политипический вид, известный как *S. uralensis*. Он имеет самый широкий ареал, на протяжении которого успешно сосуществует почти со всеми видами *Sylvaemus*. Некоторые авторы (Michaux et al., 2002) связывают с этим видом происхождение *S. alpicola* (предполагая наличие общего предка). Мы допускаем возможность такого эволюционного сценария, но нам представляется более правдоподобным увязать происхождение альпийской мыши с *S. flavicollis* (аналогично ситуации с *S. ponticus* на Кавказе). Такой вариант подкрепляется признанием самими авторами упомянутой работы поздней восточной колонизации европейских территорий видом *S. uralensis*, а также тем обстоятельством, что совсем недавно

S. alpicola была выделена из состава именно *S. flavicollis* (Filippucci, 1992).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают глубокую признательность К. Серизава и А. Гончарову за помощь, оказанную ими при выполнении настоящей работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Богданов А.С., 2001. Хромосомная дифференциация популяций малой лесной мыши *Sylvaemus uralensis* в восточной части ареала // Зоол. журн. Т. 80. С. 331–342. – 2002. Изучение ранних стадий дивергенции в группе лесных и полевых мышей с помощью молекулярно-генетических методов // Автореф. Дис. ... канд. биол. наук. М.: Ин-т биологии развития. 25 с.
- Воронцов Н.Н., Боескорев Г.Г., Межжерин С.В. и др., 1992. Систематика лесных мышей подрода *Sylvaemus* Кавказа (Mammalia, Rodentia, Apodemus) // Зоол. журн. Т. 71. № 3. С. 119–131.
- Воронцов Н.Н., Межжерин С.В. и др., 1989. Генетическая дифференциация видов-двойников лесных мышей (*Apodemus*) Кавказа и их диагностика // Докл. АН СССР. Т. 309. № 5. С. 1234–1238.
- Громов И.М., Гуреев А.А., Новиков Г.А. и др., 1963. Млекопитающие фауны СССР. М. Ч. I. 638 с.
- Громов И.М., Ербаева М.А., 1995. Грызуны // Млекопитающие фауны России и сопредельных территорий (зайцеобразные и грызуны). Определитель. СПб. Наука. С. 58–520.
- Загороднюк И.В., 1996. Виды-двойники мышей западной Европы: таксономическая диагностика и распространение // Докл. АН СССР. Т. 12. С. 166–175.
- Картавцева И.В., 2002. Эволюция кариотипа лесных и полевых мышей (Rodentia, Muridae). Владивосток. Дальнаука. 142 с.
- Межжерин С.В., 1997. Градуализм или пунктуализм: данные по генной дифференциации мелких млекопитающих Голарктики // Генетика. Т. 33. С. 518–523.
- Межжерин С.В., Загороднюк И.В., 1989. Новый вид мышей рода *Apodemus* (Rodentia, Muridae) // Вестн. зоол. № 4. С. 55–59.
- Межжерин С.В., Зыков А.Е., 1991. Аллозимная изменчивость и генетическая дивергенция лесных мышей рода *Apodemus* s. lato // Цитология и генетика. Т. 25. С. 51–59.
- Орлов В.Н., Козловский А.И. и др., 1996. Хромосомные диагнозы и место генетических таксонов в эволюционной классификации лесных мышей подрода *Sylvaemus* Европы (*Apodemus*, Muridae, Rodentia) // Зоол. журн. Т. 75. С. 88–102.
- Павлинов И.Я., Яхонтов Е.Л., Агаджанян А.К., 1995. Млекопитающие Евразии. I. Rodentia. М. Изд-во МГУ. 117 с.
- Челомина Г.Н., 1993. Дивергенция двух семейств повторяющейся ДНК лесных и полевых мышей рода *Apodemus* (Muridae, Rodentia) // Генетика. Т. 29. № 7. С. 1163–1171. – 1993а. Дифференциация ГЦ-бога-

- тых сайтов рестрикции в частоповторяющейся ДНК лесных и полевых мышей // Там же. С. 1172–1179. – 1996. Особенности рестрикционного полиморфизма ДНК европейских и азиатских видов лесных мышей рода *Apodemus* // Там же. Т. 33. № 10. С. 1381–1386. – 1998. Молекулярная филогения лесных и полевых мышей рода *Apodemus* (Muridae, Rodentia) по данным рестрикционного анализа суммарной яДНК // Там же. Т. 34. С. 1286–1292.
- Челомина Г.Н., Сузуки Х., Сучия К. и др., 1998. Секвенирование гена цитохрома *b* мтДНК и реконструкция матриархальных связей лесных и полевых мышей рода *Apodemus* (Muridae, Rodentia) // Генетика. Т. 34. № 5. С. 650–661.
- Шедько С.В., 2002. Филогения митохондриальной ДНК лососевых рыб подсемейства Salmininae: анализ последовательностей гена цитохрома *b* // Генетика. Т. 38. С. 1–11.
- Akaike H., 1974. A new look at the statistical model identification // IEEE Trans Autom. Cont. V. 19. P. 716–723.
- Anderson S., Bankier A.T., Barrell B.G. et al., 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome // Nature (London). V. 280. P. 457–465.
- Avise J.C., Bermingham F., Kessler L.G., Saunders N.C., 1984. Characterization of mitochondrial DNA variability in a hybrid swarm between subspecies of bluegill sunfish (*Lipomis macrochirus*) // Evolution. USA. V. 38. P. 931–941.
- Bellinva E., Munclinger P., Flegr J., 1999. Application of the RAPD technique for a study of the phylogenetic relationships among eight species of the genus *Apodemus* // Folia Zool. V. 48. P. 241–248.
- Bonhomme F., Israndar D., Thaler L., Fetter F., 1985. Electromorphs and phylogeny in muroid rodents // Evolutionary relationships among rodents / Eds. Luckett W.P., Hartenberger J. N.Y., L.: Plenum press. P. 671–683.
- Borisova O.K., 1993. Landscape and climate of the South-Central and Southeastern Russia plain during the Pliocene // Abstr. USGS workshop, Herndon, Virginia, USA. P. 61.
- Britton-Davidian J., Vahdati M., Benmehdi F. et al., 1991. Genetic differentiation in four *Apodemus* species from Southern Europe: *A. sylvaticus*, *A. flavicollis*, *A. agrarius* and *A. mystacinus* (Muridae, Rodentia) // Z. Säugetierk. V. 56. P. 25–33.
- Brown W.M., 1989. Evolutionary rate of animal mitochondrial DNA/Evolution of genes and proteins. Sunderland, Mass. P. 62–88.
- Bulatova N., Nadjafova R., Kozlovsky A., 1991. Cytotaxonomic analysis of species of the genera *Mus*, *Apodemus* and *Rattus* in Azerbaijan // J. Zool. Syst. Evolut. V. 29. P. 139–153.
- Cerling T.E., Harris J.M., MacFadden B.J. et al., 1997. Global vegetation change through the Miocene/Pliocene boundary // Nature. V. 389. P. 153–157.
- Corbet G.B., 1978. The mammals of the Palaearctic region: a taxonomic review. L., Ithaca: Cornell Univ. Press. 314 p.
- Cooke H.J., 1975. Evolution of the long range structure of satellite DNAs in the genus *Apodemus* // J. Mol. Biol. V. 94. № 1. P. 87–99.
- Crainhead L., Paetkan D., Reynolds H.V. et al., 1995. Microsatellite analysis of paternity and reproduction in Arctic grizzly bears // J. Heredity. V. 86. P. 255–261.
- Csaikl F., Engel W., Schmidtke J., 1980. On the biochemical systematics of three *Apodemus* species // Compar. Biochem. Physiol. V. 65. № 2. P. 411–414.
- Fauquette S., Clauson J., Suc J.P., Zheng Z., 1999. A new approach for palaeoaltitude estimates based on pollen records: example of the Mercantour massif (southeastern France) at the earliest Pliocene // Earth and Planetary Science Letters. V. 170. P. 35–47.
- Fauquette S., Guiot J., Suc J.P., 1998. A method for climatic reconstruction of the Mediterranean Pliocene using pollen data // Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology. V. 144. P. 183–201.
- Felsenstein J., 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap // Evolution. V. 39. P. 783–791.
- Filippucci M.G., 1992. Allozyme variation and divergence among European, Middle Eastern and North African species of the genus *Apodemus* (Rodentia, Muridae) // Israel. J. Zool. V. 38. P. 193–218.
- Filippucci M.G., Macholan M., Storch G., 1996. Taxonomy of the genus *Sylvaemus* in western Anatolia – morphological and electrophoretic evidence (Mammalia: Rodentia: Muridae) // Senckenbergiana Biologica. V. 75. P. 1–14.
- Gemmeke H., 1980. Protein variation und Taxonomie in der Gattung *Apodemus* (Mammalia, Rodentia) // Z. Säugetierk. V. 45. № 6. P. 348–365.
- Glemet H., Blier P., Bernatchez L., 1998. Geographical extent of Arctic Char (*Salvelinus alpinus*) mtDNA introgression in brook char populations (*S. fontinalis*) from eastern Quebec, Canada // Mol. Ecol. V. 7. P. 1655–1662.
- Hare M., 2001. Prospect for nuclear gene phylogeography // TRENDS in Ecol. Evol. V. 16. P. 700–706.
- Hartl G.B., Suchentrunk F., Willing R. et al., 1992. Inconsistency of biochemical evolutionary rates affecting allozyme divergence within the genus *Apodemus* (Muridae, Mammalia) // Biochem. Syst. Ecol. V. 20. P. 363–372.
- Hauswirth W., Laipis P., 1985. Transmission genetics of mammalian mitochondria: a molecular model and experimental evidence // Archiv. and Perspect. Mitochondrial Res. V. 2. P. 49–59.
- Hirning U., Schulz W.A., Just W. et al., 1989. A comparative study of the heterochromatin of *Apodemus sylvaticus* and *Apodemus flavicollis* // Chromosoma. V. 98. № 6. P. 450–455.
- Irwin D.M., Kocher T.O., Wilson A.C., 1991. Evolution of the cytochrome *b* gene of mammals // J. Mol. Evol. V. 32. P. 128–144.
- Johnson K.P., Sorenson M.D., 1998. Comparing molecular evolution in two mitochondrial protein coding genes (cytochrome *b* and ND2) in the dabbling ducks (Trbe: Anatini) // Mol. Phylogenet. Evolut. V. 10. № 1. P. 82–94.
- Kimura M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences // J. Mol. Evol. V. 16. P. 111–120.
- Kishino H., Hasegawa M., 1989. Estimation of the maximum likelihood estimate of the evolutionary tree topologies

- from DNA sequence data, and the branching order in Hominoidea // *J. Mol. Evol.* V. 29. P. 170–179.
- Lara M.C., Patton J.L., Da Silva M.N.F., 1996. The simultaneous diversification of South American echimyid rodents (Hystricognathi) based on complete cytochrome *b* sequences // *Mol. Phylogenet. Evol.* V. 5. P. 403–413.
- Lessa E.P., Cook J.A., 1998. The molecular phylogenetics of Tuco-Tucos (genus *Ctenomys*, Rodentia: Octodontidae) suggests an early burst of speciation // *Mol. Phylogenet. Evol.* V. 9. P. 88–99.
- Makova K.D., Nekrutenko A., Baker R.J., 2000. Evolution of microsatellite alleles in four species of mice (genus *Apodemus*) // *J. Mol. Evol.* V. 51. P. 166–172.
- Martin Y., Gerlach G., Schlotterer C., Meyer A., 2000. Molecular phylogeny of European Muroid rodents based on complete cytochrome *b* sequences // *Mol. Phylog. Evol.* V. 16. P. 37–47.
- Michaux J., Aguilar J.-P., Montuire S. et al., 1997. Les Murinae (Rodentia, Mammalia) neogenes du Sud de la France: Evolution et paléo environments // *Geobios.* V. 20. P. 379–385.
- Michaux J.R., Chevret P., Filippucci M.-G., Macholan M., 2002. Phylogeny of the genus *Apodemus* with a special emphasis to the subgenus *Sylvaemus* using the nuclear IRBP gene and two mitochondrial markers: cytochrome *b* and 12s rRNA // *Mol. Phylog. Evol.* V. 23. P. 123–136.
- Michaux J.R., Filippucci R.M., Libois R. et al., 1996. Biogeography and taxonomy of *Apodemus sylvaticus* (the wood mouse) in the Tyrrhenian region: enzymatic variations and mitochondrial DNA restriction pattern analysis // *Heredity.* V. 76. P. 267–277.
- Michaux J.R., Kinet S., Filippucci M.-G. et al., 2001. Molecular identification of three sympatric species of wood mice (*Apodemus sylvaticus*, *A. flavicollis*, *A. alpicola*) in Western Europe (Muridae, Rodentia) // *Mol. Ecol. Notes.* V. 1. P. 260–263.
- Michaux J.R., Libois R., Ramalhinho M.G., Maurois C., 1998. On the mtDNA restriction patterns variation of the Iberian wood mouse (*Apodemus sylvaticus*) comparison with other west Mediterranean populations // *Heredity.* V. 129. P. 187–194.
- Michaux J.R., Sara M., Libois R.M., Matagne R., 1998. Is the woodmouse (*Apodemus sylvaticus*) of Sicily really a “separate” species // *Belgian J. Zool.* V. 128. P. 211–214.
- Musser G.G., Brothers E.M., Carleton M.D., Hutterer R., 1996. Taxonomy and distributional records of Oriental and European *Apodemus*, with a review of the *Apodemus* – *Sylvaemus* problem // *Bonn. Zool. Beitr.* V. 46. P. 143–156.
- Musser G.G., Carleton M.D., 1993. Family Muridae // *Mammal species of the world. A taxonomic and geographic reference* / Eds D. Wilson, Reeder D.M. 2d ed. Wash.: Smiths. Inst. Press. P. 501–806.
- Nadjafova R.S., Bulatova N.Sh., Chasovlikarova Z., Gerassimov S., 1993. Karyological differences between two *Apodemus* species in Bulgaria // *Z. Saugetierk.* V. 58. P. 232–239.
- Posada D., Crandall K.A., 1998. Modeltest: Testing the model of DNA substitution // *Bioinformatics.* V. 14. P. 817–818.
- Robinson M., Catzeffis F., Briolay J., Mouchiroud D., 1997. Molecular phylogeny of rodents, with special emphasis on murids: Evidence from nuclear gene LCAT // *Mol. Phylogenet. Evol.* V. 8. P. 423–434.
- Robinson M., Gouy M., Gautier C., Mouchiroud D., 1998. Sensitivity of the relative-rate test to taxonomic sampling // *Mol. Biol. Evol.* V. 15. P. 1091–1098.
- Saitou N., Nei M., 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees // *Mol. Biol. Evol.* V. 4. P. 406–425.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., 1989. Molecular cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 509 p.
- Serizawa K., Suzuki H., Tsuchiya K., 2000. A phylogenetic view on species radiation in *Apodemus* inferred from variation of nuclear and mitochondrial genes // *Biochem. Genet.* V. 38. P. 27–40.
- Stanhope M.J., Czelusniak J., Si J.-S. et al., 1992. A molecular perspective on mammalian evolution from the gene encoding interphotoreceptor retinoid binding protein, with convincing evidence for bat monophyly // *Mol. Phylogenet. Evol.* V. 1. P. 148–161.
- Suzuki H., Minato S., Tsuchiya K., Fokin I.M., 1997. Phylogenetic position and geographic differentiation of the Japanese dormouse, *Glirulus japonicus*, revealed by variations in rDNA, mtDNA and the Sry gene // *Zool. Sci.* V. 14. P. 167–173.
- Suzuki H., Tsuchiya K., Sakaizumi M. et al., 1990. Differentiation of restriction sites in ribosomal DNA in the genus *Apodemus* // *Biochem. Genet.* V. 28. № 3/4. P. 137–149.
- Suzuki H., Tsuchiya K., Takezaki N., 2000. A molecular phylogenetic framework for the Ryuku endemic rodents *Tokudaia osimensis* and *Diplothrix legata* // *Mol. Phylogenet. Evol.* V. 5. P. 15–24.
- Swofford D.L., 2000. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other Methods). ver. 4.0b. Sinauer, Sunderland, MA.
- Tamura K., Nei M., 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees // *Mol. Biol. Evol.* V. 10. P. 512–526.
- Tegelstrom H., 1987. Transfer of mitochondrial DNA from the northern red-backed vole (*Clethrionomys rutilus*) to the bank vole (*C. glareolus*) // *J. Mol. Evol.* V. 24. P. 218–227.
- Tegelstrom H., Jaarola M., 1989. Genetic divergence in mtDNA between the wood mouse (*Apodemus sylvaticus*) and yellow necked mouse (*A. flavicollis*) // *Heredity.* V. 111. P. 49–60.
- Tong H., Jaeger J.J., 1993. Muroid rodents from the middle Miocene Fort Ternan locality (Kenya) and their contribution to the phylogeny of Muridae // *Paleontographica Abt. A.* V. 229. P. 51–73.
- Wilson C.C., Bernatchez L., 1998. The ghost of hybrid past: fixation of Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) mitochondrial DNA in introgressed population of lake trout (*S. namaycush*) // *Mol. Ecol.* V. 7. P. 127–132.
- Zima J., 1984. Chromosomes of certain small mammals from southern Bohemia and the Sunava mts. (CSSR) // *Folia. Zool.* V. 33. P. 133–141.

**MOLECULAR EVOLUTION AND PHYLOGEOGRAPHY
OF WEST-PALAEARCTIC WOOD MICES OF THE GENUS *SYLVAEMUS*
BASED ON THE DATA ON VARIATION OF NUCLEAR (IRBP)
AND MITOCHONDRIAL (CYT *B*) DNA GENES**

G. N. Chelomina¹, H. Suzuki²

¹*Institute of Biology and Soil Science, Far Eastern Division, Russian Academy of Sciences, Vladivostok 690022, Russia
e-mail: chelomina@ibss.dvo.ru*

²*University of Hokkaido, 060-08010 Sapporo, Japan*

The analysis of peculiarities of molecular organization, evolution and phylogeny of two protein-coding genes (nDNA IRBP gene (1140 bp) and mtDNA cyt *B* gene (1150 bp)) was carried out for seven wood mouse species belonging to the West-Palaeartic genus *Sylvaemus* (*S. sylvaticus*, *S. flavicollis*, *S. ponticus*, *S. fulvipectus*, *S. uralensis*, *S. alpicola* and *S. mystacinus*) to clear up their phylogenetic relationships and develop, suitable phylogeographic concept. Intra-, interspecific and intergeneric genetic distances – absolute and corrected according to Kimura's two parameter options – were computed. The distribution of different types of mutations (transitions, transversions, homoplasies, synonymous and nonsynonymous) in all codon positions and for each gene as a whole was characterized. For each molecular marker pheno- and phylogenetic relationships (UPGMA, NJ, MP, and ML from the software package PAUP) were reconstructed. A satisfactory stability of the system of phylogenetic relationships in the wood mice designed by different methods for each molecular marker was shown. At the same time, some differences between molecular phylogenies of nuclear and mitochondrial DNA regions were revealed. The analysis of matriarchal relationships specified a high probability of monophyly for the subgenus *Sylvaemus* while the data on a nuclear gene give worse support of monophyly and demonstrate its polytomy. This discrepancy is widely discussed. A new phylogeographic concept of the genus *Sylvaemus* is proposed. It assumes the differentiation of three main phylogenetic lines represented by recent *S. fulvipectus*, *S. uralensis*, and a group of the species "sylvaticus" (*S. sylvaticus*, *S. flavicollis*, *S. ponticus*, and *S. alpicola*) in the territory of Central and Asia Minor between the Miocene and the Pliocene, as well as their colonization of the European continent through various geographical areas.