

УДК 575.857:599.323.4

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ПОДВИДОВ ДОМОВОЙ МЫШИ *Mus musculus* И ИХ ТАКСОНОМИЧЕСКИЕ ВЗАИМООТНОШЕНИЯ: ДАННЫЕ RAPD-PCR-АНАЛИЗА

© 2008 г. Л. Н. Спиридонова¹, К. В. Коробицына¹, Л. В. Якименко², А. С. Богданов³

¹Биолого-почвенный институт Дальневосточного отделения Российской академии наук,
Владивосток 690022; e-mail: spiridonova@biosoil.ru

²Владивостокский государственный университет экономики и сервиса, Владивосток 690990

³Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук, Москва 119334

Поступила в редакцию 01.02.2007 г.

Окончательный вариант получен 18.06.2007 г.

Проведен RAPD-PCR-анализ генетической дифференциации шести подвидов домовой мыши: *Mus musculus musculus*, *M. m. domesticus*, *M. m. castaneus*, *M. m. gansuensis*, *M. m. wagneri* и *M. m. ssp. (bactrianus?)*. Идентифицировано 373 локуса общей протяженностью примерно 530 тпн. Выявлены таксон-специфичные молекулярные маркеры, установлены уровни подвидовых генетических отличий и показана различная степень подвидовой генетической дифференциации. Наиболее генетически сходными оказались подвиды: *M. m. castaneus* – *M. m. domesticus* и *M. m. musculus* – *M. m. gansuensis*. В предлагаемой нами филогенетической схеме максимально отличным от всех остальных подвидов оказался *M. m. wagneri*. Генетические расстояния между ним и остальными подвидами в 2–3 раза превышали значения генетических дистанций между “хорошими” видами подрода *Mus* (например, между *M. musculus* и *M. spicilegus*, *M. musculus* и *M. abbotti*). Сделанные на основе RAPD-анализа оценки генетического сходства и филогенетические связи шести подвидов домовой мыши частично согласуются с результатами, полученными цитогенетическими и аллозимными методами. Вместе с тем они значительно отличаются от филогенетических построений, выполненных по результатам секвенирования контрольного региона мтДНК, что отражает несоответствие друг другу разных систем наследования.

Генетическая дифференциация вида *Mus musculus* L., 1758, большинством исследователей рассматриваемого как надвидовой комплекс *Mus musculus*, в настоящее время изучена весьма детально. Вместе с тем применение разных методов генетического анализа, значительная географическая неравномерность в изучении таксонов домовой мыши вызвали ряд вопросов. Так, связь наблюдаемой изменчивости с таксономической принадлежностью, значимость изменчивости по разным системам признаков, влияние гибридизации на изменчивость – вот неполный спектр вопросов, возникающих у исследователей.

Во второй половине прошлого века усилиями преимущественно специалистов в области биохимической генетики была выявлена сложная подразделенность синантропных форм домовой мыши на несколько генетически дискретных групп: *musculus*, *domesticus*, *castaneus*, *bactrianus* [1–5]. Нет общепринятого мнения относительно их таксономического статуса. По мнению одних исследователей, вид *M. musculus* s. str. включает 3–4 подвидовые группы – *musculus*, *domesticus*, *castaneus*, *bactrianus* [4, 5]. Согласно другой точке зрения, видовая самостоятельность перечисленных таксонов очевидна [6, 7]. Обсуждение этих взгля-

дов выходит за рамки настоящего исследования. Заметим только, что на данный момент мы по-прежнему придерживаемся первой из систем домовой мыши.

Видовая самостоятельность дикоживущих *Mus spicilegus*, *M. spretus* и *M. abbotti* доказана результатами экспериментальной гибридизации и общепризнана. Дикоживущие либо семисинантропные мыши Центральной Азии и частично Дальнего Востока – *M. m. wagneri*, *M. m. gansuensis* (= *M. m. raddei*) и *M. m. manchui* – рассматриваются в качестве подвидов в составе *M. musculus* s. str. Помимо определенного сходства в образе жизни, мыши этих таксонов слабо различимы по внешним морфологическим признакам. На этом основании и по данным молекулярно-генетического анализа [8, 9] ранее мы высказали мнение о возможности выделения центрально-азиатских домовых мышей в отдельную подвидовую группу *wagneri* [10]. Необходимо, однако, напомнить, что в отличие от европейских дикоживущих видов мыши группы *wagneri* не утратили способности свободно скрещиваться с другими представителями *M. musculus* s. str. [11].

Гибридизация синантропных и семисинантропных подвидов домовой мыши в природе – яв-

ление, широко распространенное, влияющее на гетерогенность популяций [7]. Смещение в гибридных зонах диагностических признаков (морфологических, аллозимных, кариологических, мтДНК) разных таксонов затрудняет определение таксономической принадлежности участников интрогрессий. Кроме того, признаки, являющиеся диагностическими для каких-то подвидов, непригодны для дифференциации других. К примеру, перспективные для дифференциации ряда подвидов кариологические характеристики оказались неприемлемыми для разделения *M. m. castaneus* и *M. m. domesticus*. Размеры центромерных блоков гетерохроматина, характер их распределения в кариотипе, тип X-хромосомы, отсутствие маркерных аутосом – все эти параметры одинаковы у обоих подвидов. Использование для реконструкций таксономических взаимоотношений одного из передовых методов – анализа контрольного региона мтДНК, также представляется недостаточным вследствие незначительной доли кодируемой информации. У домового мыши, к примеру, мтДНК составляет всего 0.2% от всей ДНК клетки, у человека – 1%, у большинства млекопитающих мтДНК кодирует только 13 белков, а у дрожжей – не более 20 [12]. Разногласия, как будет показано далее, в результатах исследований подвидов домового мыши разными методами подчеркивают необходимость комплексного подхода к исследованию изменчивости, включающего классические и современные молекулярно-генетические методы.

Используемый в настоящей работе RAPD-PCR-анализ, успешно зарекомендовавший себя в наших прошлых работах с домовым мышью [13–15], применим для исследования внутривидового генетического полиморфизма, межпопуляционной и межвидовой дифференциации, установления филогенетических связей. Он может быть использован при изучении феномена гибридизации, для оценки масштабов и направления интрогрессии генов, в исследованиях по географии [16, цит. по: 17]. В случае выявления таксон-специфичных молекулярных маркеров этот метод способен помочь в решении таксономических проблем.

Результаты наших предыдущих исследований, в которых было проанализировано около 180 особей *M. musculus* из 29 точек бывшего СССР, продемонстрировали высокое сходство RAPD-спектров домовых мышей из различных локалитетов [9, 13–15]. Вместе с тем наряду с характерными для большинства мышей фрагментами отмечались уникальные, встречающиеся либо в каких-то локалитетах, либо у отдельных особей. Следует заметить, что, как правило, RAPD-PCR-анализ проводился параллельно с цитогенетическим исследованием и анализом мтДНК на одних и тех же экземплярах мышей. Сопоставле-

ние кариологических характеристик и гаплотипов мтДНК, маркирующих тот или иной подвид, с различными уникальными RAPD-профилями позволило предположить принадлежность каждого из последних одному из подвидов: *musculus*, *domesticus*, *castaneus*, *gansuensis*, *wagneri*. Подобное определение носило, несомненно, условный характер, ибо у некоторых особей могли регистрироваться признаки разных подвидов, что подтверждало гибридное происхождение этих животных. Тем не менее мы сочли возможным весь проанализированный ранее материал использовать в качестве базы для отбора особей в настоящую работу.

Цель данной работы – поиск подвидоспецифичных молекулярных маркеров и анализ генетической дифференциации и таксономических взаимоотношений шести подвидов домового мыши посредством RAPD-анализа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выбор экземпляров, пригодных для данного анализа, был сопряжен с определенными трудностями, связанными с практически повсеместной гибридизацией домовых мышей азиатской части бывшего СССР. Поскольку в анализе предполагалось использование тотальной клеточной ДНК и работа с генетически разнородным материалом могла повлиять на корректность выводов, мы руководствовались следующим методическим подходом. Из ранее проанализированного материала в настоящее исследование включались лишь те немногие особи, для которых определение таксономической принадлежности разными методами приводило к совпадающим результатам, т.е. те экземпляры, которые по комплексу признаков (внешней морфологии, кариологии, мтДНК) могли быть отнесены к одному и тому же подвиду. Таким образом, мы смогли отобрать от 2 до 8 особей каждого из следующих подвидов: *musculus* (г. Новосибирск); *gansuensis* (Читинская обл., пос. Цасучей); *castaneus* (Камчатка, г. Елизово); *domesticus* (Приморский край, с. Иннокентьевка); *wagneri* (Казахстан, Семипалатинская обл., Аксуатский р-н (естественный биотоп)); *bactrianus*(?) (Туркменистан, Лебапский велаят, окр. г. Сейди и п. Ходжайпиль (38° с.ш. и 66° в.д.)). Для лучшей сопоставимости результатов мы взяли одинаковое количество особей (по 2 экз.) каждого из подвидов. Для последнего подвида было допущено исключение из описанных выше правил отбора анализируемых особей. Этот материал, не прошедший предварительного типирования по кариотипу и мтДНК и отнесенный к *bactrianus* лишь на основании некоторых внешнеморфологических признаков и места его отлова, был включен в анализ в надежде обнаружить RAPD-маркеры *bactrianus*. Помня о существовании в Средней Азии (в т.

ч. в Туркмении) гибридной зоны [11] и возможной встрече там как разных подвидов, так и их гибридов, здесь и далее мы упоминаем наш *bactrianus* со знаком “?”.

Придавая статус “подвидоспецифичного” тому или иному RAPD-фрагменту, мы брали во внимание его исключительную принадлежность определенному подвиду, предварительно типированному по морфологии, хромосомам и мтДНК. Мы отдаем себе отчет в том, что некоторые подвидоспецифичные маркеры при значительном увеличении объема выборок и привлечении к исследованию новых таксонов могут потерять свой таксономический вес, но в настоящем анализе они оказались удобными и имели высокую воспроизводимость в работе.

ДНК получали из фиксированной в 70%-ном этаноле печени, по стандартной методике, с использованием протеиназы К и последующей обработкой фенолом, смесью хлороформ–изоамиловый спирт, а также переосаждением изопропиловым и этиловым спиртами [18]. Для обнаружения молекулярных подвидоспецифичных маркеров были применены 27 десятинуклеотидных случайных праймеров (НПФ “Литех” и “Operon Technologies Inc.”, США), с различной последовательностью и 60–70%-ным содержанием (G + C)-пар. Все праймеры давали хорошо читаемые и воспроизводимые продукты амплификации (табл. 1). PCR проводили по описанной нами ранее методике [15]. С целью контроля воспроизводимости результатов для каждого праймера были проведены 2–3 PCR-реакции. RAPD-продукты анализировали с помощью электрофореза в 2%-ном агарозном геле, содержащем 0.5 мкг/мл бромистого этидия в 1× TBE-буфере, и фотографировали в УФ-свете. В качестве маркеров молекулярной массы использовали *Pst*I-гидролизат ДНК фага λ и ДНК маркер M25 (100 пн + 2000 пн + 3000 пн, Сибэнзим). По электрофореграммам составляли бинарные матрицы, где присутствие полосы обозначалось “1”, отсутствие – “0”. При подсчете фрагментов учитывали все визуально детектируемые полосы.

Для оценки генетических различий между подвидами вычисляли генетические дистанции D_N [19] и использовали показатель генетической подразделенности (G_{st}) [20]. Для построения фило- и фенограмм использовали пакеты программ TFGPA [21] и TREECON ver. 1.3 [22].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Таксон-специфичные молекулярные маркеры. Количество фрагментов в RAPD-профилях, полученных при использовании разных праймеров, изменялось от 7 до 31, а молекулярный вес – от 0.216 до 2.605 тпн, составляя в среднем 1.41 тпн.

Всего идентифицировано 373 признака. Используемые в работе праймеры обнаружили высокое сходство спектров амплифицированных фрагментов шести подвидов *M. musculus*. Однако RAPD-спектры ДНК у *wagneri* во многих случаях значительно отличались от набора фрагментов у остальных подвидов. Подвидоспецифичные молекулярные маркеры представлены в табл. 1. Между подвидами *M. musculus* наблюдались не только качественные отличия по молекулярному весу фрагментов (причем иногда всего на несколько десятков пар нуклеотидов), но и по мажорности ампликонов при одинаковых условиях PCR. Чаще, чем у других, у *wagneri* наблюдались хорошо выраженные мажорные фрагменты ДНК (количество ДНК в одном таком фрагменте колеблется от 1500 до 4000 нг) (рис. 1).

Из 27 праймеров для каждого из подвидов дифференцирующими были: *wagneri* – 9 праймеров, *domesticus* – 4, *musculus*, *castaneus*, *bactrianus*(?) – по 2, *gansuensis* – 1 (см. табл. 1). На рис. 1 представлены некоторые, характеризующие подвиды, RAPD-спектры ДНК мышей, амплифицированной разными праймерами. Обнаружен мажорный ампликон OPD-05₁₀₀₀, который дискриминировал геномы *domesticus*, *castaneus* от геномов *musculus*, *wagneri* и *bactrianus*(?), а у *gansuensis* был полиморфным. Напомним, что два первых подвида кариологически неразличимы, и выявленный генетический признак подчеркивает это сходство и одновременное их отличие от остальных рассматриваемых подвидов. Для установления тождественности нуклеотидной последовательности данного фрагмента необходимо его дальнейшее исследование.

Генетическая дифференциация по RAPD-признакам обнаружила между подвидами домовой мыши следующие взаимоотношения. Наиболее низкие генетические дистанции выявлены между следующими парами подвидов, которые мы схематично расположили по степени возрастания D_N : *gansuensis/bactrianus*(?) $\rightarrow$ *musculus/gansuensis* $\rightarrow$ *domesticus/bactrianus*(?) $\rightarrow$ *domesticus/castaneus* $\rightarrow$ *castaneus/bactrianus*(?) $\rightarrow$ *domesticus/gansuensis* $\rightarrow$ *castaneus/gansuensis* (табл. 2). Причем значения генетических дистанций (D_N) в первых пяти сравниваемых парах коррелировали с оценками генетической подразделенности (G_{st}), а в случаях пар *domesticus/gansuensis* и *castaneus/gansuensis* значения G_{st} оказались выше, чем можно было ожидать. Генетические отличия подвидов *domesticus* и *castaneus* от *musculus* были несколько больше, чем в остальных парах, и вполне согласовывались со значениями их генетической подразделенности. Максимальные отличия характеризовали *wagneri*. Генетические расстояния между ним и каждым из остальных подвидов в 2–3 раза превышали таковые при сравнении подвидов между собой (см. табл. 2).

Таблица 1. Используемые в работе праймеры и выделенные молекулярные маркеры, специфичные для разных подвидов

Праймеры	Нуклеотидная последовательность (5' → 3')	Подвидоспецифичные маркеры	MgCl ₂
1. OPA-02	TGCCGAGCTG	—	2 mM
2. OPA-05	AGGGGTCTTG	—	2.5 mM
3. OPA-06	GGTCCCTGAC	—	2 mM
4. OPA-08	GTGACGTAGG	—	2 mM
5. OPA-10	GTGATCGCAG	<i>w</i> _{646, 805} , <i>b</i> _{468, 444}	2 mM
6. OPA-12	TCGGCGATAG	<i>w</i> ₁₀₄₄ , <i>d</i> ₇₈₀ , <i>b</i> ₆₇₇	2.5 mM
7. OPA-16	AGCCAGCGAA	<i>w</i> _{748, 1628}	2 mM
8. OPC-02	GTGAGGCGTC	<i>g</i> ₁₁₅₅	2 mM
9. OPC-05	GATGACCGCC	<i>w</i> _{1053, 847}	2 mM
10. OPC-07	GTCCCGACGA	<i>m</i> ₅₀₀ , <i>d</i> _{1092, 759} , <i>c</i> ₈₀₀ , <i>w</i> ₆₁₅	2 mM
11. OPC-08	TGGACCGGTG	<i>w</i> ₉₂₅ , <i>c</i> ₁₂₁₆ , <i>d</i> ₉₀₀	0.5 mM
12. OPC-10	TGTCTGGGTG	—	2 mM
13. OPC-12	TGTCATCCCC	—	2.5 mM
14. OPC-16	CACACTCCAG	—	2 mM
15. OPD-05	TGAGCGGACA	<i>m</i> ₇₀₀ , <i>w</i> ₈₅₁	0.5 mM
16. OPD-06	ACCTGAACGG	<i>w</i> ₇₆₃ , <i>d</i> ₇₂₅	2.5 mM
17. OPE-20	AACGGTGACC	<i>w</i> ₁₅₇₇	0.5 mM
18. OPF-01	ACGGATCCTG	—	2 mM
19. OPF-03	CCTGTCACC	—	2 mM
20. OPF-04	GGTGATCAGG	—	2 mM
21. OPE-05	CCGAATTCCC	—	2.5 mM
22. OPF-10	GGAAGCTTGG	—	1.5 mM
23. OPF-11	TTGGTACCCC	—	2 mM
24. OPF-12	ACGGTACCAG	—	2 mM
25. OPF-15	CCAGTACTCC	—	2.5 mM
26. OPF-19	CCTCTAGACC	—	2 mM
27. OPF-20	GGTCTAGAGG	—	3 mM

Примечание. *m* – *M. m. musculus*, *d* – *M. m. domesticus*, *c* – *M. m. castaneus*, *g* – *M. m. gansuensis*, *w* – *M. m. wagneri*, *b* – *M. m. ssp. (bactrianus?)*. Нижний индекс указывает молекулярный вес маркерного фрагмента.

Таблица 2. Генетическая дифференциация (D_N , выше диагонали) и подразделенность (G_{st} , ниже диагонали) подвидов *Mus musculus* (по 373 признакам)

Подвиды <i>M. musculus</i>	<i>musculus</i>	<i>gansuensis</i>	<i>castaneus</i>	<i>domesticus</i>	<i>M. m. ssp. (bactrianus?)</i>	<i>wagneri</i>
<i>musculus</i>	—	0.088	0.135	0.132	0.127	0.212
<i>gansuensis</i>	0.404	—	0.111	0.105	0.075	0.228
<i>castaneus</i>	0.430	0.445	—	0.097	0.102	0.254
<i>domesticus</i>	0.435	0.443	0.380	—	0.090	0.236
<i>M. m. ssp. (bactrianus?)</i>	0.431	0.389	0.392	0.379	—	0.197
<i>wagneri</i>	0.520	0.589	0.552	0.548	0.518	—

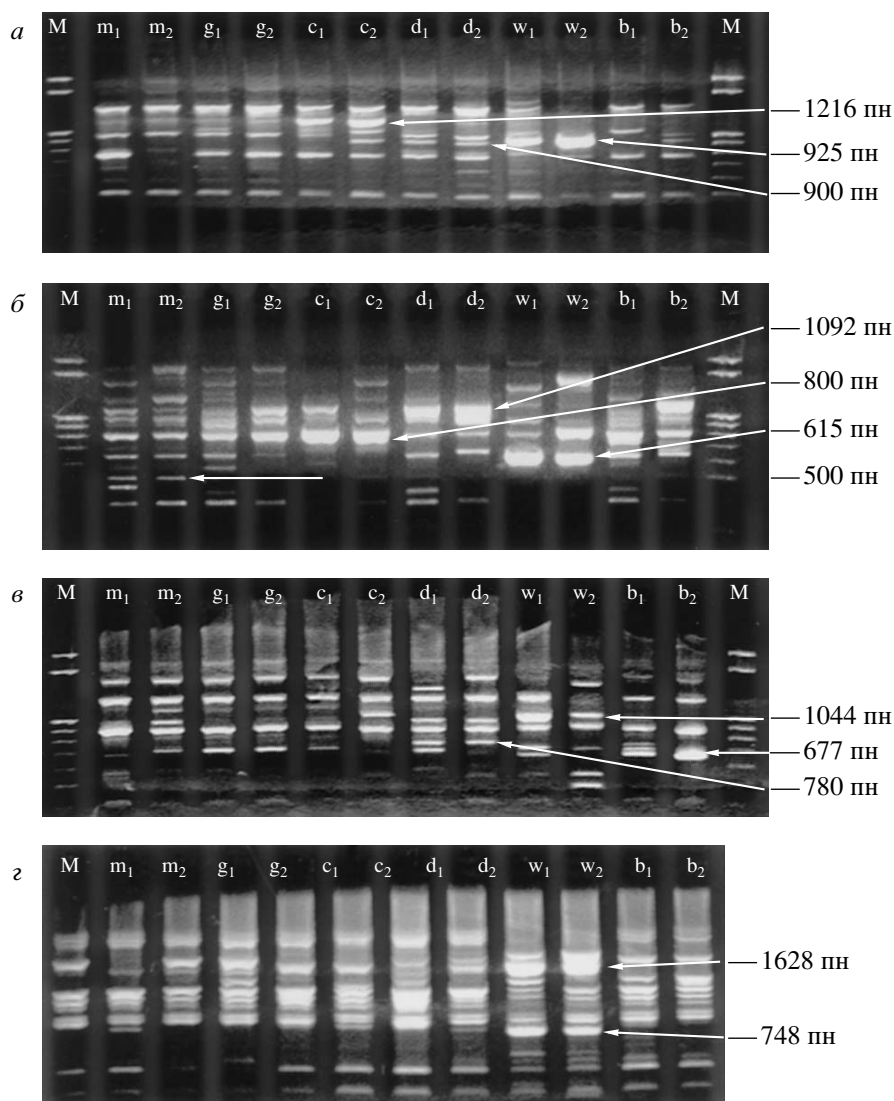


Рис. 1. RAPD-спектры образцов totalной ДНК подвидов *M. musculus*, полученные с помощью праймеров OPC-08 (а), OPC-07 (б), OPA-12 (в) и OPA-16 (г): m – *M. m. musculus*, g – *M. m. gansuensis*, c – *M. m. castaneus*, d – *M. m. domesticus*, w – *M. m. wagneri*, b – *M. m. bactrianus*(?). M – маркер 25 M. Стрелками указаны маркерные фрагменты, характеризующие подвиды.

Фено- и филогенетические реконструкции. Для установления генетических взаимосвязей между исследованными подвидами были построены UPGMA- и NJ-деревья для отдельных особей и UPGMA-реконструкция для подвидов. Дерево, построенное методом ближайшего связывания (NJ) (см. рис. 2,а) с бутстрепными оценками степени надежности ветвления, отделяет только *wagneri* (100%) и *bactrianus*(?) (100%). Можно предположить о близости подвидов *domesticus*–*castaneus* (бутстреп-индекс 60–77%), в то же время объединение *gansuensis* с *musculus* на NJ-реконструкции недостоверно. Дерево генетического подобия UPGMA, построенное при сравнении подвидов (см. рис. 2,б), показывает, что особи *bactrianus*(?) входят в один подкластер с *musculus* и *gan-*

suensis, а *wagneri* и здесь выделяется в отдельный базальный кластер, отчетливо обособленный от остальных образцов (100%). Эта дендрограмма выявила генетическую близость подвидов *domesticus* с *castaneus* и *bactrianus*(?) с *gansuensis*. Сходство подвидов последней пары может быть обусловлено гибридным происхождением мышей из Туркмении. Это предположение требует дополнительной проверки. Несмотря на то, что подвид *musculus* на UPGMA-дендрограмме объединился с *bactrianus*(?) и *gansuensis*, в то же время он оказался несколько удален от них. Еще раз подчеркнем, что в каждом из построений получены 100%-ные значения бутстреп-индексов, подтверждающие генетическую обособленность *wagneri* от остальных подвидов *M. musculus*.

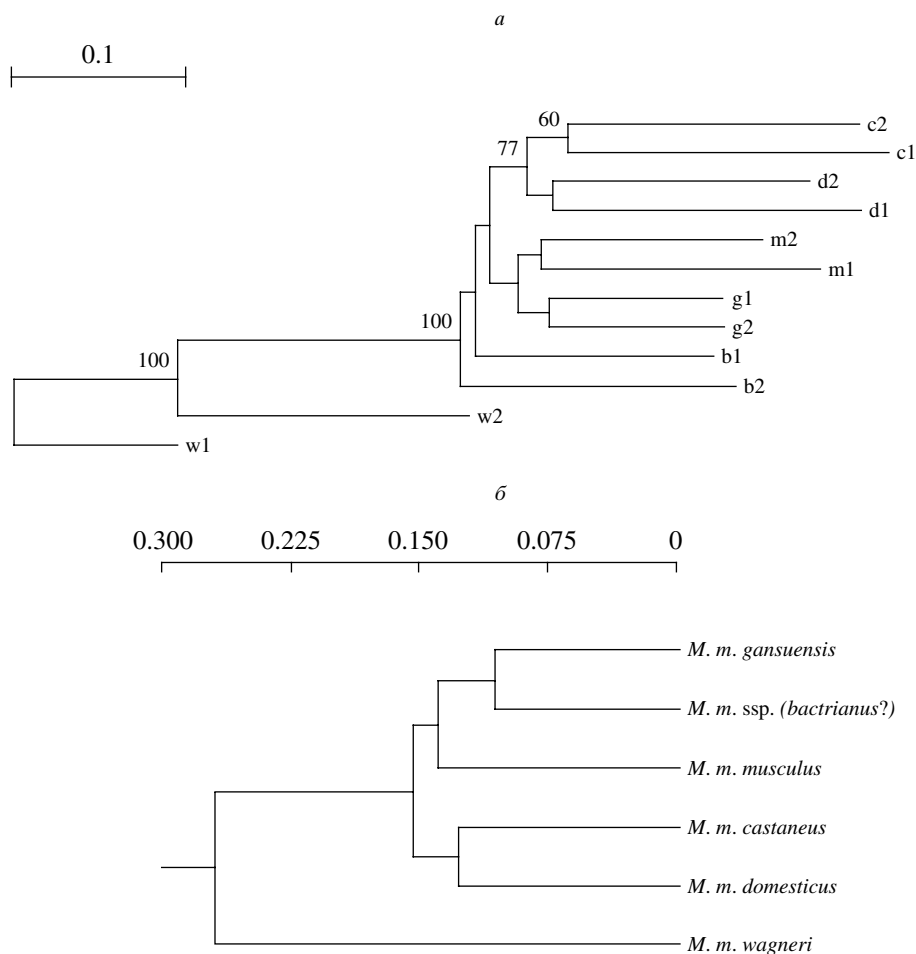


Рис. 2. Филогенетические отношения (NJ) (а) и генетическое сходство (UPGMA) (б) подвидов *M. musculus*, реконструированные по данным RAPD-анализа. В узлах ветвлений приведены значения BP $\geq 50\%$. Обозначения: m – *musculus*, g – *gansuensis*, c – *castaneus*, d – *domesticus*, w – *wagneri*, b – *M. m. ssp. (bactrianus?)*.

ОБСУЖДЕНИЕ

RAPD-анализ позволяет исследовать генетический полиморфизм по большому числу независимых локусов, рассеянных по всему геному. В последнее время установлено, что среди продуктов амплификации, полученных RAPD-методом, представлены все типы последовательностей ДНК: уникальные гены, средние и высокие повторы [17]. У близкородственных видов, которые слабо дифференцированы по другим признакам, RAPD-маркеры в большинстве случаев выявляют скрытую генетическую изменчивость [23]. Учитывая все вышесказанное и имея положительный опыт применения RAPD-анализа, мы использовали данную методику для поиска таксонспецифичных RAPD-маркеров некоторых подвидов домового мыши.

Многочисленные сравнительно-морфологические, этологические, генетико-биохимические, кариологические и молекулярно-генетические исследования трех-четырёх последних десятилетий

значительно расширили наши представления о путях расселения и формирования ареала, систематике домового мыши. Тем не менее, как уже было сказано, единая общепризнанная классификация группы до сих пор отсутствует. Одним из важных, если не главным препятствием на пути решения этой проблемы, является характерный для домового мыши феномен обширных гибридных зон между подвидами, достигшими разных стадий дифференциации. Явление гибридизации активно изучается [1, 4, 10, 11, 24, 25]. Его роль в геногеографии и интрогрессии таксон-специфичных маркеров значительна. В результате гибридизации, помимо формирования новых таксонов (*M. m. molossinus* [26]), возникает, по выражению Е.В. Котенковой, процесс “дедифференциации” [7], т. е. постоянного смешения и размывания диагностических признаков. В большой степени именно эта причина определила те сложности и ограничения в подборе материала для исследования, о которых говорилось выше.

Ранее нами было показано, что домовые мыши, морфологически и кариологически типированные как представители какого-то определенного подвида, могли иметь маркеры ядерной и митохондриальной ДНК разных подвидов [15]. Попытки типирования домашних мышей из разных регионов с помощью методов кариологии, аллозимного анализа, секвенирования контрольного региона мтДНК выявили во множестве случаев такое несоответствие диагнозов. Причины противоречий кроются в связанной с гибридизацией интрогрессии генов ядерной и митохондриальной ДНК далеко за подвидовые границы.

Данные кариологического анализа и секвенирования генов мтДНК очень важны и необходимы при идентификации подвидов *M. musculus*. Однако их применение для выявления гибридных особей и глубины процессов гибридизации не всегда продуктивно. В силу ограниченности разрешающей способности любых методов во многих случаях не обнаруживается присутствие таксон-специфичных маркеров различных подвидов у отдельной особи. Кариологический и аллозимный анализы, секвенирование отдельных ядерных и митохондриальных генов могут выявить присутствие разных подвидовых маркеров в одной выборке, не выявляя при этом индивидуальной внутригеномной гетерогенности каждой из особей. Напротив, исследование с помощью произвольных праймеров всего генома, выявляющее большее число маркеров, эффективно при определении таксон-специфичных признаков, оценке масштабов гибридизации и направления интрогрессии генов разных подвидов.

Обнаруженная нами генетическая близость *domesticus* и *castaneus* (см. рис. 2, а, б) вполне согласуется с результатами, полученными цитогенетическими методами. Оба подвида очень сходны по кариологическим характеристикам (см. выше). По данным К. Мориваки [5], *domesticus* и *castaneus* более близки друг к другу, чем к *musculus*. Сходные выводы высказаны в обзоре Ж. Сантоса с соавт. [27]. Помимо уже известных отличительных для *domesticus* и *castaneus* внешнеморфологических признаков, нам удалось выявить и RAPD-признаки, дифференцирующие эти подвиды (см. табл. 1).

Процессы интрогрессивной гибридизации подвидов *M. musculus*, происходящие на значительной части бывшего СССР [8–10, 15, 25 и мн. др.], глубоко “перемешали” признаки подвидов, и у одного животного могут быть выявлены одновременно разные сочетания маркеров нескольких таксонов. Так, в популяциях Приморского края, судя по морфологическим признакам, заметно присутствие *castaneus*, однако кариологические признаки этого подвида здесь очень редки [11]. Интересно, что по данным секвенирования участ-

ка D-петли мтДНК *castaneus* оказался ближе к *bactrianus* и *musculus*, чем к *domesticus* [8]. А.Н. Милишников с соавт. [28] также показал сходство *castaneus* и *bactrianus* по аллозимным данным.

Кариологический метод позволил надежно дифференцировать морфологически трудно различимые *wagneri* и *gansuensis* [10]. Заметим, что ни аллозимный анализ, ни результаты исследования мтДНК не обнаруживали между этими подвидами отличий. RAPD-анализ не только подтвердил обособленность этих таксонов, но и обнаружил ставший для нас неожиданным факт их глубокой молекулярно-генетической дифференциации. Уровень генетических дистанций между *wagneri* и остальными подвидами (D_N от 0.197 до 0.254, см. табл. 2) значительно превышает таковой для пар *M. musculus* – *M. spicilegus* и *M. musculus* – *M. abbotti* ($D_N = 0.181$ и 0.147 соответственно) [15]. Результат проведенного сравнения позволяет после дополнительных исследований ставить вопрос о возможном повышении систематического ранга *M. m. wagneri* до видовой и, вероятно, в будущем по-новому взглянуть на таксономическую схему подрода *Mus*. Однако уже сейчас, по результатам настоящего исследования, можно заметить следующее. Основанное на экологической близости (общая привязанность к степям и полупустыням, семисинантропность), сходстве внешних морфологических признаков, высказанное ранее предложение [10] об объединении *wagneri*, *gansuensis* и *manchu* в составе единой подвидовой группы “*wagneri*” (с выведением их из подвидовой группы “*musculus*”) теперь вызывает определенные сомнения. К сожалению, в нашем распоряжении отсутствовала выборка *manchu*, т.е. не все члены рассматриваемой группы могли быть проанализированы. Однако дифференциация *wagneri* и *gansuensis* значительна, а уровень генетических дистанций между *wagneri* и каждым из остальных подвидов (см. табл. 2) вряд ли позволяет говорить о возможном его рассмотрении в единой группе с любым из исследованных подвидов.

Таким образом, наше исследование подтвердило генетическое сходство *M. m. domesticus* и *M. m. castaneus* по яДНК и показало несомненную генетическую обособленность *M. m. wagneri* от остальных подвидов домашней мыши. Оценки генетического сходства и таксономических взаимоотношений шести подвидов домашней мыши по RAPD-анализу в целом соответствуют данным, полученным цитогенетическими и аллозимными методами, и значительно отличаются от результатов секвенирования мтДНК [8], что, возможно, отражает различия в характере и скорости изменений ядерного и митохондриального геномов, а также в способе их наследования.

Авторы выражают глубокую благодарность А.П. Крюкову за помощь и ценные советы, а также В.С. Лукаревскому, В.Г. Потанскому, О.В. Брандлеру и А.Ю. Пузаченко за помощь в отлове домовых мышей.

Работа выполнена при частичной поддержке программ Президиума РАН “Биоразнообразие и динамика генофондов” (грант ДВО РАН 06-I-П11-030) и ОБН РАН “Фундаментальные основы управления биологическими ресурсами” (грант ДВО РАН 06-I-ОБН-095).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Selander R.K., Hunt W., Yang S.Y. Protein polymorphism and genetic heterozygosity in two European subspecies of the house mouse // *Evolution*. 1969. V. 23. P. 379–390.
2. Hunt W.G., Selander R.K. Biochemical genetics of hybridization in European house mice // *Heredity*. 1973. V. 31. P. 11–33.
3. Britton J., Thaler L. Evidence for the presence of two sympatric species of mice (genus *Mus* L.) in southern France based on biochemical genetics // *Biochem. Genet.* 1978. V. 16. P. 213–225.
4. Bonhomme F., Catalan J., Britton-Davidian J. et al. Biochemical diversity and evolution in the genus *Mus* // *Biochem. Genet.* 1984. V. 22. P. 275–303.
5. Moriwaki K. Wild mouse from a geneticist's viewpoint // *Genetics in Wild Mice* / Eds K. Moriwaki et al. Tokyo: Japan Sci. Soc. Press; Basel: S. Karger, 1994. P. XI–XIII.
6. Marshall J.T., Sage R.D. Taxonomy of the house mouse // *Symp. Zool. Soc. London*. 1981. V. 47. P. 15–25.
7. Котенкова Е.В. Гибридизация синантропных видов домовых мышей и ее роль в эволюции // *Успехи соврем. биол.* 2002. Т. 122. № 6. С. 580–593.
8. Yonekawa H., Tsuda K., Yakimenko L.V. et al. Genetic diversity, geographic distribution and evolutionary relationships of *Mus musculus* subspecies based on polymorphisms of mitochondrial DNA // *Проблемы эволюции*. Владивосток: Дальнаука, 2003. Т. 5. С. 90–108.
9. Chelomina G.N., Spiridonova L.N., Moriwaki K., Yonekawa H. Genetic variation and geographical differentiation in house mice of some regions of Central and East Asia from the former USSR: RAPD-PCR data // *Proc. Intern. Sympos. “Species and Genetic of Wild Animals in East Asia”*. Hayama, 2000. P. 18.
10. Коробицына К.В., Якименко Л.В. Роль и место *wagneri*-подобных форм домовых мыши (Rodentia, Muridae) в фауне России и сопредельных стран // *Зоол. журн.* 2004. Т. 83. № 8. С. 1018–1030.
11. Якименко Л.В., Коробицына К.В., Фрисман Л.В. и др. Цитогенетика и систематика домовых мышей России и прилежащих стран // *Проблемы эволюции*. Владивосток: Дальнаука, 2003. Т. 5. С. 62–89.
12. Льюин Б. Гены. М.: Мир, 1987. 543 с.
13. Челомина Г.Н., Спиридонова Л.Н., Мориваки К. Генетическая вариабельность домовых мышей Дальнего Востока России по данным RAPD-PCR анализа // 4-й съезд Териологич. о-ва: Тез. докл. М., 1999. С. 274.
14. Челомина Г.Н., Спиридонова Л.Н., Йонекава Х., Мориваки К. RAPD-PCR анализ генетического разнообразия домовых мышей: таксономическая диагностика и свидетельства *musculus* × *domesticus* гибридизации на российском Дальнем Востоке // *Систематика и филогения грызунов и зайцеобразных*. Сб. стат. 2000. С. 182–184.
15. Спиридонова Л.Н., Челомина Г.Н., Мориваки К. и др. Генетическое и таксономическое разнообразие домовых мышей в азиатской части бывшего СССР // *Генетика*. 2004. Т. 40. № 10. С. 1378–1388. (Spiridonova L.N., Chelomina G.N., Moriwaki K. et al. Genetic and taxonomic diversity of the house mouse *Mus musculus* from the Asian part of the former Soviet Union // *Rus. J. Genetics*. 2004. V. 40. № 10. P. 1134–1143.)
16. Hadrys H., Balik M., Schiewater B. Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology // *Mol. Ecol.* 1992. V. 1. P. 55–63.
17. Гречко В.В. Молекулярные маркеры ДНК в изучении филогении и систематики // *Генетика*. 2002. Т. 38. № 8. С. 1013–1033. (Grechko V.V. Molecular DNA markers in phylogeny and systematics // *Rus. J. Genetics*. 2002. V. 38. № 8. P. 851–868.)
18. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 474 с.
19. Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals // *Genetics*. 1978. V. 89. P. 583–590.
20. Gregorius H.-R. The concept of genetic diversity and its formal relationship to heterozygosity and genetic distances // *Math. Biosci.* 1978. V. 41. P. 253–271.
21. Miller M.P. Tools for population genetic analysis (TFPGA) 1.3: A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. 1997. Computer software distributed by author.
22. Van de Peer Y., De Wachter R. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment // *Comput. Applic. Biosci.* 1994. V. 10. P. 569–570.
23. Хрисанфонов Г.Г., Семенова С.К., Рысков А.П. Клонирование и характеристика РАПИД-маркеров генома паразитических нематод *Trichinella spiralis* и *T. pseudospiralis* // *Мол. биол.* 2000. Т. 34. № 5. С. 828–833.
24. Boursot P., Auffray J.C., Britton-Davidian J., Bonhomme F. The evolution of house mice // *Ann. Rev. Ecol. and Systematics*. 1993. V. 24. P. 119–152.
25. Фрисман Л.В., Коробицына К.В., Якименко Л.В., Воронцов Н.Н. Какие биохимические группы домовых мышей обитают на территории СССР // *Эволюционные и генетические исследования млекопитающих: Тез. докл.* Владивосток: ДВО АН СССР, 1990. Т. 1. С. 35–54.
26. Yonekawa H., Moriwaki K., Gotoh O. et al. Hybrid origin of Japanese mice “*M. m. molossinus*”: evidence from restriction analysis of mitochondrial DNA // *Mol. Biol. Evol.* 1988. V. 5. № 1. P. 63–78.

27. Santos J., Cole Y., Pellicer A. Phylogenetic relationships among laboratory and wild-origin *Mus musculus* strains on the basis of genomic DNA RFLPs // Mamm. Genome. 1993. V. 4. № 9. P. 485–492.
28. Милюшиников А.Н., Лавренченко Л.А., Лебедев В.С. Происхождение домашних мышей Закавказья (надвидовой комплекс *Mus musculus*). Новый взгляд на пути их расселения и эволюцию // Генетика. 2004. Т. 40. № 9. С. 1234–1250. (Milishnikov A.N., Lavrenchenko L.A., Lebedev V.S. Origin of the House mice (Superspecies Complex *Mus musculus* sensu lato) from the Transcaucasia Region: A new look at dispersal routes and evolution // Rus. J. Genetics. 2004. V. 40. № 9. P. 1011–1026.)

Genetic Differentiation of Subspecies of the House Mouse *Mus musculus* and Their Taxonomic Relationships Inferred from RAPD-PCR Data

L. N. Spiridonova^a, K. V. Korobitsyna^a, L. V. Yakimenko^b, and A. S. Bogdanov^c

^a Institute of Biology and Soil Sciences, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690022 Russia;
e-mail: spiridonova@biosoil.ru

^b Vladivostok State University of Economics and Service, Vladivostok, Russia

^c Kol'tsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia

Genetic differentiation of six subspecies of the house mouse *Mus musculus* (*Mus musculus musculus*, *M. m. domesticus*, *M. m. castaneus*, *M. m. gansuensis*, *M. m. wagneri*, and *M. m. ssp. (bactrianus?)*) was examined using RAPD-PCR analysis. In all, 373 loci of total length of about 530 kb were identified. Taxon-specific molecular markers were detected and the levels of genetic differences among the subspecies were estimated. Different degree of subspecific genetic differentiation was shown. The most similar subspecies pairs were *M. m. castaneus*–*M. m. domesticus* and *M. m. musculus*–*M. m. gansuensis*. In our phylogenetic reconstruction, *M. m. wagneri* proved to be most different from all the other subspecies. Genetic distances between it and other subspecies were two- to threefold higher than those between the “good” species of the subgenus *Mus* (e.g., between *M. m. musculus* and *M. spicilegus*, *M. musculus* and *M. abbottii*). The estimates of genetic similarity and the taxonomic relationships between six house mouse subspecies inferred from RAPD partially conformed to the results based on cytogenetic and allozyme data. However, they were considerably different from phylogenetic reconstructions based on sequencing of the control mtDNA region, which reflects mutual inconsistency of different systems of inheritance.