

Г.Н. Челомина

**ЛЕСНЫЕ
И ПОЛЕВЫЕ МЫШИ**
**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ
АСПЕКТЫ ЭВОЛЮЦИИ
И СИСТЕМАТИКИ**



RUSSIAN ACADEMY OF SCIENCES
FAR EASTERN BRANCH

Institute of Biology and Soil Science

G.N. CHELOMINA

WOOD AND FIELD MICE
Molecular-genetic
aspects of evolution
and systematics

Vladivostok
Dalnauka
2005

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
ДАЛЬНЕВОСТОЧНОЕ ОТДЕЛЕНИЕ

Биолого-почвенный институт

Г.Н. ЧЕЛОМИНА

ЛЕСНЫЕ И ПОЛЕВЫЕ МЫШИ
Молекулярно-генетические
аспекты эволюции
и систематики

Владивосток
Дальнаука
2005

Челомина Т.Н. Лесные и полевые мыши: Молекулярно-генетические аспекты эволюции и систематики. Владивосток: Дальнаука, 2005. 204 с. ISBN 5-8044-0442-3.

В работе обобщены собственные и литературные данные молекулярно-генетических исследований лесных и полевых мышей, объединяемых российскими зоологами в секцию «Apodemus». Особое внимание уделено рассмотрению представлений об организации и эволюции эукариотического генома, о взаимодействии его отдельных компонентов, филогении и геносистематике. Предлагается концепция «спирального» характера изменения полиморфизма длин рестрикционных фрагментов клеточной ДНК во времени, гипотетическая схема молекулярной организации и эволюции сатДНК мышевидных грызунов. Часть работы посвящена дискуссионным вопросам, связанными с таксономическими проблемами грызунов. Обосновывается необходимость таксономической ревизии группы лесных мышей, приведены доказательства собственной трактовки некоторых ее положений, излагается новая филогеографическая концепция. Обсуждаются общетеоретические проблемы биологического вида, видообразования и эволюции.

Книга адресована молекулярным генетикам, зоологам, экологам и всем интересующимся проблемами вида и молекулярной эволюции.

Ил. 43, табл. 9, библи. 326.

Chelomina G.N. Wood and field mice: Molecular-genetic aspects of evolution and systematics. Vladivostok: Dalnauka, 2005. 204 p. ISBN 5-8044-0442-3.

Own and literature data of molecular-genetic researches on the wood and field mice united by Russian zoologists in section «Apodemus» are generalized in this work. The special attention is given consideration of questions about the organization and evolution of eukaryotic genome, about interaction of its separate components, and gene systematics. The concept of «spiral» characters of changes in cellular DNA RFLP during evolutionary time, and the hypothetical scheme of the molecular organization and evolution of rodent satDNA are developed. The part of work is devoted to the debatable questions, connected with taxonomical problems of rodents. Necessity of taxonomical revision of wood mice group is proved, evidences of the own treatment of its some positions are given, a new phylogeographical concept is stated. General theoretical problems of biological species, speciation and evolution are discussed.

The book is addressed to molecular genetists, zoologists, ecologists and all who are interested in problems of species and molecular evolution.

III. 43, tabl. 9, bibl. 326.

Ответственный редактор д. б. н. *А.Л. Дроздов*

Рецензенты: д. б. н. проф. *А.И. Пудовкин*, д. б. н. проф. *В.А. Костенко*

Утверждено к печати Ученым советом БПИ ДВО РАН

Предисловие

После открытия в конце 50-х годов XX в. биохимического полиморфизма белков, т. е. того, что один и тот же белок может быть представлен в виде многих вариантов — изозимов (или аллозимов), большие усилия биологов направлены на изучение молекулярной дивергенции живых организмов. В первые годы они были сконцентрированы на электрофоретическом анализе белкового полиморфизма, который был основан на гипотезе, что ограниченные аминокислотные различия белков отражают изменения генов. Полагали, что изозимы (или аллозимы) наследуются как аллели одного гена, и поэтому изменения изоэлектрической точки белка отражают изменения в генах. Однако последние два десятилетия XX в. ознаменовались интенсивными исследованиями регуляции действия генов. Выяснили несколько уровней регуляции генной экспрессии в смысле наличия в клетке генного продукта — белка. Оказалось, что экспрессия генов регулируется на претранскрипционном, транскрипционном, посттранскрипционном, трансляционном и посттрансляционном уровнях. Один ген может кодировать несколько белковых продуктов. Только в результате альтернативного сплайсинга первичных транскриптов иРНК один ген может служить матрицей для многих сотен зрелых иРНК благодаря тому, что они состоят из разных экзонов. Это привело к пониманию того, что белковый полиморфизм не прямо отражает изменения структурных генов. В молекулярной генетике больше усилий стало прилагаться к прямому исследованию ДНК. Широкое распространение получили методы гибридизации ДНК, рестрикционного анализа, секвенирования отдельных генов. Каждый из них имеет свои достоинства и недостатки. Так, результаты RAPD-PCR не всегда хорошо воспроизводятся, анализ митохондриальной ДНК может давать противоречивые результаты. Известны случаи встраивания в митохондриальную ДНК фрагментов ядерной ДНК, что может быть причиной явления гетероплазмии — сосуществования более одного типа мтДНК внутри клетки или индивидуума.

Последняя треть прошлого века прошла под знаком осознания единства органического мира, с одной стороны, и его вели-

чайшего разнообразия, с другой. Генетические закономерности эволюции, характерные для насекомых, не полностью применимы для других групп организмов, в частности для позвоночных животных, в том числе для приматов, что особенно интересно. Оказалось, что уровень генетических различий между разными видами дрозофил выше, чем между родами рыб или птиц. Генетическая дивергенция между родами у приматов ниже, чем у видов-двойников дрозофилы. По этой причине изучение молекулярных закономерностей эволюции уместно осуществлять не только на «генетической героине» — дрозофиле, но и на других группах животных. Современный анализ механизмов эволюционного процесса во многом основывается на исследованиях генетических преобразований популяций. Именно генетические рекомбинации являются движущей силой эволюционного развития. Очевидно, что понимание этих явлений в значительной степени связано с выяснением структурно-функциональной организации генома. В этом отношении к настоящему времени изучено несколько сот видов из нескольких миллионов, обитающих на Земле.

Задача выявления филогенетических связей и построение системы мышевидных грызунов (Muridae) является интересной и важной. Это семейство очень разнообразно и широко распространено по всей Земле, за исключением экстремальных полярных районов. Монография Г.Н. Челоминой посвящена молекулярно-генетическому изучению лесных и полевых мышей и основывается главным образом на результатах собственных исследований. Выбор лесных мышей для целей изучения закономерностей эволюции по структурным и регуляторным генам очень удачен. Это многочисленная и полиморфная группа. Среди них даже имеются случаи внутривидовых хромосомных форм (кариоморф). Помимо теоретического данная книга может иметь и практическое значение для понимания закономерностей эволюции в связи с важностью мышей в природных биогеоценозах, как переносчиков инфекций и как вредителей сельского хозяйства.

Это добротное высококвалифицированное исследование, являющееся одним из достижений эволюционной териологической школы профессора Николая Николаевича Воронцова, которой, несомненно, может гордиться отечественная биология. На многих видах этих грызунов проведены широкие исследования их моле-

кулярно-генетического разнообразия. Проводилось генотипирование, поиск молекулярных маркеров для видов, подвидов и популяций, реконструирование филогенетических связей, выявление особенностей молекулярной эволюции отдельных геномных компонентов и их связей с надмолекулярной организацией генома. Часть оригинальных предварительных материалов, вошедших в монографию, опубликовано в журнале «Генетика», совместно с Н.Н. Воронцовым, что является несомненным свидетельством высокого качества научной работы как по поставленным задачам, так и по уровню их решения.

Л.Л. Дроздов

Введение

Наиболее существенные изменения эволюционных представлений вызваны появлением знаний на молекулярном уровне.

Ф. Айяла

Термин «genetics» (как наука о наследственности) введен в 1905 г. английским биологом У. Бейтсоном, но слово «genetique» (в значении только прилагательного — «генетический») было известно еще с 1874 г. как «дидактический термин, имеющий отношение к смене поколений» (Львов, 1987). В настоящее время его значение стало существенно шире, чем просто «генетический», или «наука о наследственности». Бурное развитие генетика получила в XX столетии, начало которого ознаменовалось переткрытием законов Г. Менделя. Именно тогда Г. де Фризом была разработана мутационная теория, согласно которой ведущую роль в эволюции играет видообразовательная, или мутационная, изменчивость. К выводу, что гены играют ключевую роль в функционировании и эволюции высших организмов, пришли спустя более полувека после открытия Г. Менделем в 1866 г. законов, положенных в основу генетики. Понимание молекулярных основ наследственности стало возможным после открытия в 1953 г. Дж. Уотсоном и Ф. Криком химической структуры ДНК, хотя первая гипотеза о физико-химической природе генов и хромосом была сформулирована русским генетиком Н.К. Кольцовым еще в 1927 г. Предложенная американскими физиками модель двойной спирали (за которую авторы в 1962 г. были удостоены Нобелевской премии) объясняла, каким образом генетическая информация может быть записана в молекуле ДНК и как данная молекула может самовоспроизводиться. Это открытие явилось мощным стимулом для теоретических и экспериментальных работ, приведших к быстрому развитию молекулярной генетики. Единство всего живого было подтверждено фактом, что генетический код един для всех организмов. Основы российской школы молекулярной филогенетики были заложены А.Н. Белозерским и его учениками в середине прошлого века. Значительную роль в раз-

витии теории молекулярной эволюции сыграла концепция «молекулярных часов» Е. Цукеркандла и Л. Полинга, а также теория нейтральности молекулярной эволюции М. Кимуры. Формализованное критериев, используемых молекулярной филогенетикой, дает ей принципиальное преимущество перед традиционным подходом, так как позволяет избегать субъективизма в оценке значимости тех или иных признаков, а также критериев их эволюционной продвинутости. Молекулярные основы наследственности остаются главной темой современной генетики. Генетика является сердцевинной биологической науки, и только в ее рамках разнообразие жизненных форм и процессов может быть осмысленно как единое целое (Айала, Кайгер, 1988).

Роль генетических методов в эволюционных исследованиях заметно усилилась с открытием ферментов рестрикции и модификации, а также разработкой таких высоких технологий, как молекулярное клонирование и секвенирование последовательностей ДНК, полимеразная цепная реакция. Появилась уникальная возможность проведения экспериментов по серийному секвенированию нуклеотидных последовательностей ДНК, анализа микроэволюционных процессов в малых и изолированных популяциях различных видов, проведения генетических исследований на самых низких таксономических уровнях. Сформировались новые отрасли знаний — молекулярная экология и филогеография, открывающие дополнительные перспективы и позволяющие получать более совершенную информацию о биоразнообразии в пространстве и времени. В совокупности с молекулярной филогенетикой они приближают нас к созданию наиболее естественной системы живых организмов, открывают перспективу историко-фаунистических реконструкций, способствуя пониманию путей и механизмов развития экосистем в целом. Значимость эволюционного подхода в биологии, поддержанная многими видными учеными, афористически выражена Ф. Добржанским (Dobzhansky, 1937), считавшим, что в биологии все приобретает смысл лишь в свете эволюционного учения.

В предлагаемой работе приведены результаты собственных молекулярно-генетических исследований лесных и полевых мышей, дополненные сведениями из литературных источников. Основная цель — выявление молекулярных основ биологического разнообразия животных, т. е. видообразования и эволюции, а также возможностей молекулярной геносистематики и филогео-

графии. Изложенные данные дополняют существующие представления об общих закономерностях эволюции на молекулярном уровне и ее взаимосвязи с экологической пластичностью видов, кариотипическими изменениями генома эукариот, о соотношении темпов эволюционных преобразований по разным системам признаков, демонстрируют необходимость применения молекулярно-генетических исследований в решении конкретных таксономических задач и разработки корректной систематики.

Помимо настоящего введения, книга содержит три главы, каждая из которых объединяет материал в хронологическом порядке, и заключение. В первой и второй главах приведены данные анализа молекулярной эволюции, филогении и систематики группы лесных и полевых мышей, полученные с помощью разных молекулярных маркеров (некодирующих последовательностей ДНК, а также структурных генов), имеющих различный тип наследования. Третья глава посвящена анализу особенностей внутривидовой генетической дифференциации лесных и полевых мышей. Текст снабжен иллюстративным материалом, к нему также прилагаются подробный терминологический словарь и список сокращений.

Автор благодарит своих коллег из Биолого-почвенного института ДВО РАН М.В. Павленко и И.В. Картавцеву, С.В. Межжерина (Институт зоологии им. И.И. Шмальгаузена УАН, Киев), А.С. Богданова (Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН) за сотрудничество и предоставление коллекционных сборов лесных мышей, а также Х. Сузуки (Университет Хоккайдо, Япония), без которого невозможно было бы секвенирование ядерных и митохондриальных генов. Автор выражает глубокую признательность за внимательный и доброжелательный анализ книги д. б. н. А.Л. Дроздову, д. б. н. профессору А.И. Пудовкину и д. б. н. профессору В.А. Костенко. Особая благодарность Николаю Николаевичу Воронцову и Елене Алексеевне Ляпуновой за постоянный интерес и внимание к настоящему исследованию.

Работа выполнена при частичной поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 97-04-49793).

**МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭВОЛЮЦИЯ, ФИЛОГЕНИЯ
И СИСТЕМАТИКА ПО ДАННЫМ ПОЛИМОРФИЗМА
ДЛИН РЕСТРИКЦИОННЫХ ФРАГМЕНТОВ
СУММАРНОЙ яДНК**

Гармоничное взаимодействие всего сущего проистекает из того, что все живые существа являются частями иерархии родственных единств... и повинуются они лишь внутренним влияниям собственной природы.

«Ч ж у а н - ц з ы » (III в. до н. э.)

Мышевидные грызуны являются одной из наиболее часто используемых модельных систем при изучении широкого круга биологических проблем. Семейство мышиных — типичный представитель тропической фауны с двумя основными центрами происхождения: более древним в Юго-Восточной Азии и вторичным — в Африке. Среди млекопитающих семейство Muridae является самым большим: оно включает почти треть всех видов (1326) класса Mammalia, а подсемейство Murinae — более 90 % всех известных его родов, распространенных главным образом в тропиках и субтропиках Юго-Восточной Азии, на островах Зондского архипелага, в Африке и Австралии (Musser, Carleton, 1993). Лесные и полевые мыши — группа, до недавнего времени объединяемая в единый род *Apodemus*, — являются в местах обитания массовыми видами и потому представляют собой важный экологический и эпизоотический фактор. Обитают они как алло-, так и симпатрично, существенно различаясь по типам ареалов: от мелких островных или горных изолятов до широких ареалов, почти полностью охватывающих континенты (рис. 1, 2). Заселение лесными мышами среднеширотных широколиственных лесов Палеарктики делает их почти уникальной таксономической группой среди 122 родов подсемейства Muridae, распространение которых ограничено субтропическим и тропическим ареалом Старого Света

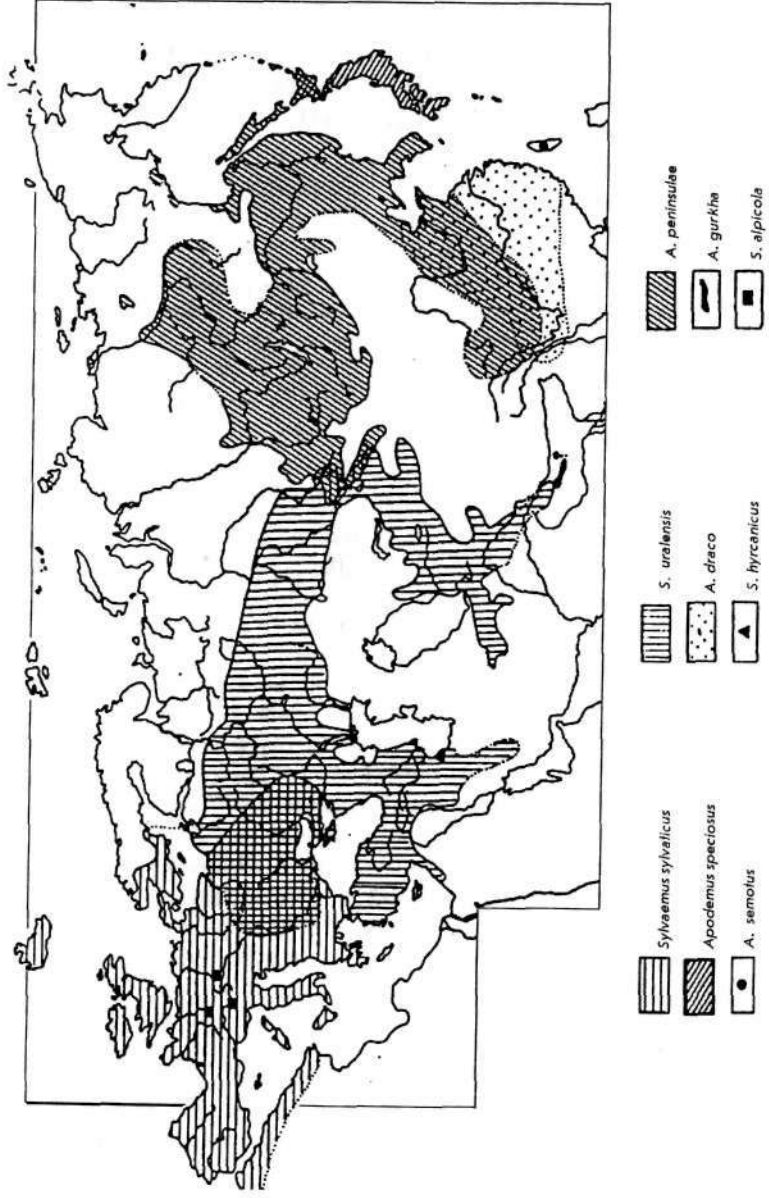


Рис. 1. Карта ареалов 9 видов лесных и полевых мышей (по: Пантелеев, 1998)

Fig. 1. Map of areas for 9 species of wood and field mice (from: Panteleyev, 1998. — Russian)

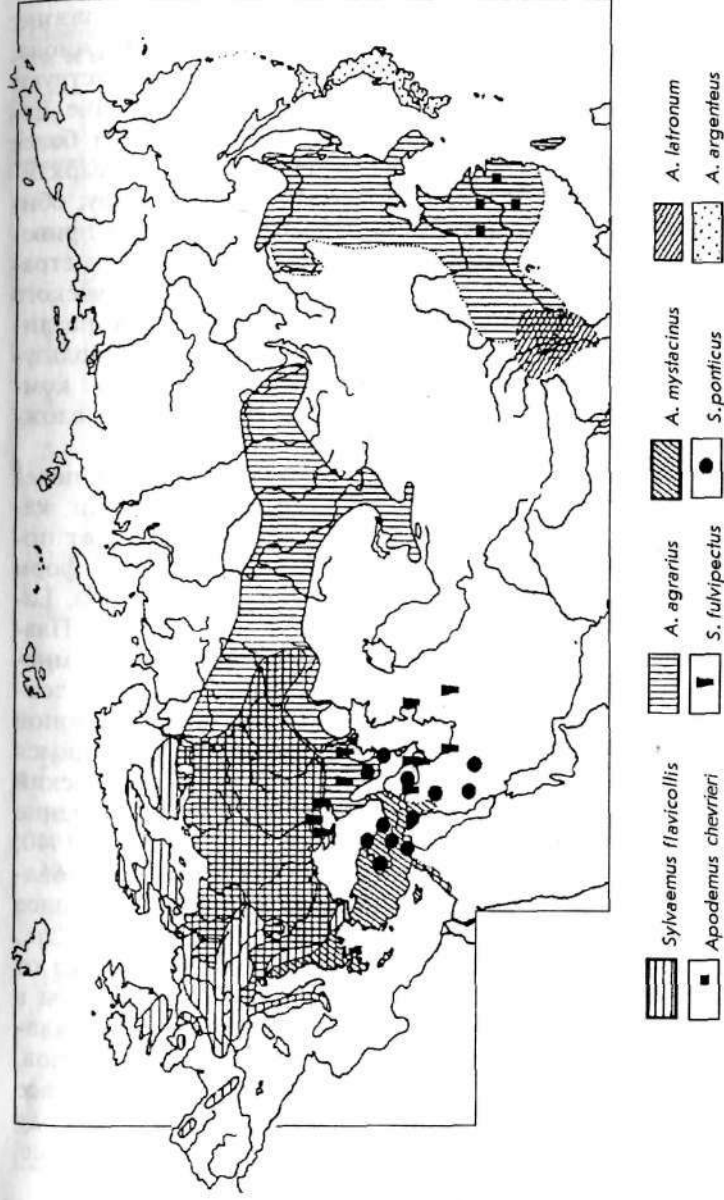


Рис. 2. Карта ареалов 8 видов лесных и полевых мышей (по: Пантелеев, 1998)

Fig. 2. Map of areas for 8 species of wood and field mice (from: Panteleyev, 1998. — Russian)

(Musser, Carleton, 1993). Считается, что основное видообразование лесных мышей проходило в широком временном диапазоне: от раннего плейстоцена до современности (Громов, Баранова, 1981; Павлинов и др., 1995). В современной фауне присутствуют как эволюционно относительно молодые виды, населяющие Европу и Кавказский регион (Западная Палеарктика), так и более старые, принадлежащие азиатской фауне (Восточная Палеарктика). Широкая распространенность мышей по земному шару, обитание в различных климатических и биотических условиях привели к различным проявлениям адаптивной и эволюционной стратегии видов, что способствовало увеличению их биологического разнообразия и генетической дифференциации. Поэтому неудивительно, что представители лесных и полевых мышей используются в качестве удобной природной модели для изучения комплекса биологических проблем, в том числе традиционно сложных для данной группы таксономических исследований.

Современная зоологическая классификация лесных и полевых мышей базируется прежде всего на данных морфологии, кариологии и биохимического типирования. В зависимости от позиций авторов выделяется от 14 до 21 вида и примерно 35 форм подвидового ранга, принадлежащих к 2—4 под родам (Громов, Баранова, 1981; Воронцов и др., 1992; Musser, Carleton, 1993; Павлинов и др., 1995) (табл. 1). Тем не менее полного единства мнений относительно таксономической классификации среди зоологов пока не достигнуто. Ситуация осложняется неравномерной изученностью видов данной группы, а также продолжающимся первоописанием новых форм (Воронцов и др., 1992; Козловский и др., 1990; Fillprucci et al., 1989). Кроме того, существует мнение о возможности гибридогенного видообразования (Гептнер, 1940; Ларина, 1962; Завадский, 1968) и продолжения формообразовательных процессов в популяциях лесных мышей и в настоящее время (Воронцов и др., 1992; Fillprucci et al., 1989; Орлов и др., 1996). Хотя систематика лесных и полевых мышей еще далека от завершения, тем не менее названия по всему тексту приведены в соответствие с современной российской зоологической номенклатурой: *Sylvaemus* — первое имя западнопалеарктических видов, *Apodemus* — восточнопалеарктических. Так как первоначально все виды лесных и полевых мышей причислялись к единому роду *Apodemus*, а в настоящее время на этот счет существуют серьезные

Список современных видов лесных и полевых мышей (по: Павлинов и др., 1995)
list of modern species of wood and field mice (from: Pavlinov et al., 1995. — Russian)

| № п/п | Латинское название | Английское название | Русское название |
|----------|---|----------------------------------|---|
| | <i>Apodemus</i> | Field mice | Азиатские мыши |
| | <i>A. (agrarius) agrarius</i> (Pallas, 1771) | Striped field mouse | Полевая мышь |
| | <i>A. (agrarius) chevrieri</i> (Milne-Edwards, 1868) | Chinese field mice | Китайская мышь |
| | <i>A. (alsomys) gurkha</i> Thomas, 1924 | Himalayan field mouse | Гималайская лесная мышь |
| | <i>A. (alsomys) draco</i> (Barret-Hamilton, 1900) | Kvantun's mouse | Квантунская мышь |
| | <i>A. (alsomys) argenteus</i> (Yem-minck, 1844) | Small Japanese field mouse | Малая японская лесная мышь |
| | <i>A. (alsomys) speciosus</i> (Tem-minck, 1844) | Red (large) Japanese field mouse | Красная, или большая, японская мышь |
| | <i>A. (alsomys) latronum</i> Thomas, 1911 | Sychuan's mouse | Сычуанская мышь |
| | <i>A. (alsomys) semotus</i> Thomas, 1908 | Taiwan field mouse | Тайваньская лесная мышь |
| | <i>A. (alsomys) peninsulae</i> (Thomas, 1907) | East-Asian (Korean) wood mouse | Восточноазиатская (корейская) лесная мышь |
| | <i>Sylvaemus</i> | Wood mice | Лесные мыши |
| 10 | <i>S. (sylvaemus) alpicola</i> Heinrich, 1952 | Alpine wood mice | Альпийская мышь |
| 11 | <i>S. (sylvaemus) flavicollis</i> (Melchior, 1834) | Yellow-necked mouse | Желтогорлая мышь |
| 12 | <i>S. (sylvaemus) fulvipectus</i> Ognev, 1924 | Steppe wood mouse | Степная мышь |
| 13 | <i>S. (sylvaemus) arianus</i> (Blandford, 1881) | | |
| 14 | <i>S. (sylvaemus) hermonensis</i> Fillppucci et al., 1989 | | |
| 15 | <i>S. (sylvaemus) hyrcanicus</i> Vorontsov et al., 1992 | Talysh wood mouse | Талышская мышь |
| 16 | <i>S. (sylvaemus) ponticus</i> Sviridenko, 1936 | Caucasus wood mouse | Кавказская мышь |
| 17 | <i>S. (sylvaemus) rusiges</i> Miller, 1913 | | |

| № п/п | Латинское название | Английское название | Русское название |
|-------|---|---------------------|----------------------------|
| 18 | <i>S. (sylvaeus) sylvaticus</i> (Pinnaceus, 1758) | Wood mouse | Лесная мышь |
| 19 | <i>S. (sylvaeus) uralensis</i> (Pallas, 1811) | Pygmy wood mouse | Малая лесная мышь |
| 20 | <i>S. (sylvaeus) wardi</i> (Wroughton, 1908) | | |
| 21 | <i>Apodemus (karstomys) mystacinus</i> (Danford et Alston, 1877,) | Broat-toothed mouse | Малоазийская (горная) мышь |

возражения, мы оставили прежнее название, но взяли его в кавычки — «*Apodemus*».

Согласно имеющимся кариологическим данным группа лесных мышей может рассматриваться как модельная система для изучения особенностей молекулярной эволюции генома у видов с постепенным (нехромосомным) формообразованием: почти все представители имеют одинаковое число хромосом ($2n=48$). Теоретически стабилизация кариотипа должна обеспечивать возможность дивергенции основной части повторяющихся последовательностей ДНК по пути постепенного накопления мелких мутаций. Это модель так называемого градуального видообразования, базирующегося на внутривидовой наследственной изменчивости. Согласно этим представлениям видообразование — длительный процесс адаптации, реализующийся либо через темпоральную трансформацию вида («анагенез»), либо через географическую изоляцию популяций («истинное видообразование», или «кладогенез»). Альтернативный способ формообразования, вызывавший совсем недавно дебаты и получивший в настоящее время широкое признание, называется сальтационным (Воронцов, 1999). Такой путь возникновения видов является быстрым потому, что обусловлен мутациями именно видовых признаков, ведущих к репродуктивной изоляции. Но самая большая сложность заключается как раз в том, чтобы определить, какие из мутаций затрагивают видовые свойства и способны таким образом радикально изменить судьбу таксона.

Потенции видов в отношении как адаптации, так и формообразования существенно различаются. Анализируя системные

реорганизации генома при видообразовании, В.Н. Стегний (1993) выделяет «виды-генераторы» и «виды-терминаторы», характеризующиеся соответственно лабильным и консервативным геномом. Виды с лабильным геномом занимают центральное положение в филогенетически близких группах, являются генераторами образования дочерних видов, у которых геном становится консервативным. Как правило, они узкоспециализированы и имеют ограниченный ареал. Виды, занимающие терминальное положение, характеризуются более высокими адаптивными возможностями: у них больший ареал, распространение в зонах контрастных климатических и экологических условий. Под это определение подходят и лесные мыши. Э.С. Бауэр (1936) считал, что материал для эволюции поставляют не победители в борьбе за существование, а побежденные, т. е. не те виды, которые имеют в данный момент самый обширный и наступающий ареал. По мнению В.А. Бердникова (1991), напротив, неспециализированные примитивные виды (эволюционно активные) обладают большим запасом неинформативной ДНК по сравнению с «процветающими» (эволюционно инертными) видами. Такого же мнения придерживался С.С. Шварц (1980), полагавший, что потенциальные виды обеспечивают вспышку адаптивной радиации и дают начало новому роду, объединяющему множество видов; виды узкой специализации приобретают морфологические отличия родового и более высокого ранга и дают начало монотипическим таксонам. В какой-то степени, на примере лесных и полевых мышей, мы надеемся разрешить эту дилемму.

1.1. Дивергенция двух семейств повторяющейся ДНК

Открытие повторяющейся ДНК (Britten, Kohne, 1968) явилось важным этапом в истории исследования генома эукариот. В настоящее время известно, что значительная часть ДНК эукариотической клетки (до 80 %) представлена повторяющимися нуклеотидными последовательностями, неоднородными по физико-химическим свойствам (нуклеотидному составу, повторяемости, количеству, размеру) и способу организации (кластерный, тандемный, диспергированный). Функции, которые они выполняют, также весьма разнообразны и до конца не изучены. На се-

годняшний день доказано, что повторяющиеся последовательности способны усиливать транскрипцию, транскрибируются, а некоторые продукты транскрипции могут транслироваться. Они участвуют в рекомбинационных процессах, узнавании и расхождении хромосом в митозе и мейозе, являются активным материалом в преобразовании хромосом. Повторяющиеся последовательности ДНК выполняют защитные функции, способствуют повышению изменчивости организмов. Во фракцию повторяющейся ДНК входят различные типы транспозонов, ретровирусов, сайты репликации и транскрипции, а также последовательности ДНК, потенциально способные влиять на процессы транскрипции и репликации. Все повторы способны перемещаться по геному. Таким образом, имеющиеся знания о структуре и функции повторяющейся ДНК, ее высокая представленность в геномах подтверждают важность и необходимость дальнейших исследований. В целом наличие повторов в эукариотическом геноме создает огромный потенциал для генетической изменчивости. Обеспечивая лабильность генома, они могут привести к «скачкам» не только в молекулярной эволюции, но и в эволюции видов (Хесин, 1984; Курильски, Гашлен, 1987; Потапов и др., 1990).

Большую помощь в изучении молекулярной структуры геномов оказало открытие в бактериях специфических ферментов рестрикции и разработка метода рестрикционного анализа ДНК. Естественной функцией рестриктаз является защита бактериальной клетки от вирусной инфекции. Они рестрицируют, т. е. ограничивают, размножение чужеродной ДНК путем ее деградации. Собственная ДНК клетки остается нативной, так как она специфически модифицирована. За открытие ферментов модификации-рестрикции и их применение в молекулярной генетике (что легло в основу нового направления в молекулярной биологии — геной инженерии) группа ученых (В. Арбер, Д. Натане и Х. Смит) в 1978 г. была удостоена Нобелевской премии. Первая рестриктаза была получена в 1970 г., сейчас их известно более 400. Эти ферменты «узнают» определенные последовательности, т. е. сайты рестрикции (обычно 4–6 пар нуклеотидов (пн) длиной), в двухцепочечной ДНК и расщепляют молекулу ДНК в этих участках. Распределение сайтов узнавания по геному в целом имеет случайный характер, а частота разрывов определяется длиной последовательности узнавания фермента. Чем длиннее эта последова-

тельность, тем реже происходят разрывы ДНК. Но практически всегда обработка эукариотической ДНК рестриктазами приводит к образованию множества фрагментов. Если гель, на котором разделяют продукты гидролиза, прокалбировать, можно определить длину любого индивидуального фрагмента ДНК. Для этого в одну из дорожек наносят смесь стандартных фрагментов известного размера (маркеров). Соотношение между размером исследуемого фрагмента и пройденным им расстоянием устанавливают по скорости миграции маркеров.

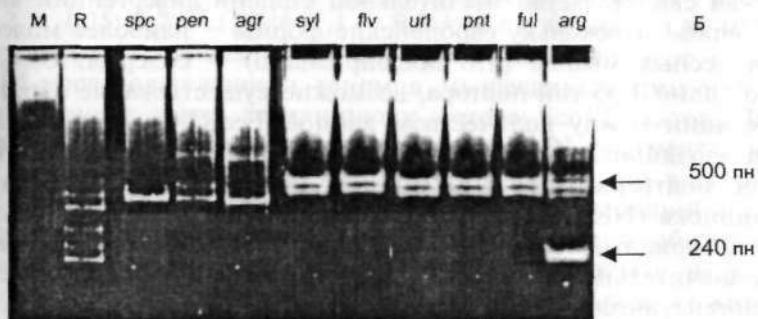
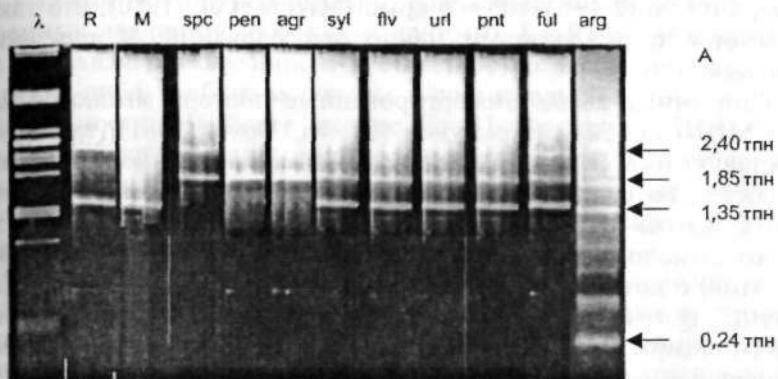
Открытие В. Ботштейном в 1980 г. с помощью рестриктаз нового генетического полиморфизма — полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ или RFLP) (Dowling et al., 1990) дало возможность изучать свойства и наследование конкретных последовательностей ДНК. Анализ последовательностей геномной ДНК позволяет маркировать различные участки хромосом и картировать гены. Метод рестрикционного анализа яДНК в его оригинальном исполнении является достаточно удобным для межвидовых сравнений в силу своей простоты, информативности и внутривидовой стабильности выявляемых признаков. Перспективность такого подхода убедительно продемонстрирована работами Д. Джиллесли с соавторами (1986), исследовавшими геномы приматов, и подтверждена другими авторами, изучавшими геномы рыб (Шубина, Медников, 1986) и млекопитающих (Pina-de-Faria et al., 1984; Лушникова и др., 1989). Оказалось, что некоторые повторяющиеся последовательности являются консервативными в эволюции и могут принадлежать к таксонам высокого ранга (семейство, класс, отряд). Другие эволюционируют значительно быстрее и могут быть видоспецифичными. На основании результатов рестрикционного анализа, таким образом, можно судить об эволюции различных последовательностей ДНК, генома и вида в целом.

Нами проведен сравнительный анализ двух семейств повторяющейся ДНК лесных и полевых мышей группы «Apodemus», выщепляемых нуклеазами рестрикции (рестриктазами) EcoRI- (диспергированные повторы) и HpaIII-(catДНК), впервые описанных в 1975 г. Н. Куком (Cooke, 1975). Несмотря на то что уже была опубликована серия работ (Cooke, 1975; Brown, Dover, 1979, **1981**; Hirning et al., 1989) по исследованию физико-химических свойств, структурной организации и локализации этих последова-

тельностью на хромосомах, тема оставалась далеко не исчерпанной. Так, за пределами внимания оказались некоторые восточно-европейские и азиатские формы. Нами были поэтому протестированы вначале геномы шести видов лесных и полевых мышей: желтогорлой *Sylvaemus flavicollls*, европейской *S. sylvaticus*, малой *S. uralensis*, восточноазиатской *Apodemus peninsulae*, японской (красной) *A. speciosus* и *A. agrarius*. Параллельно вели анализ ядерной ДНК домашней мыши *Mus musculus* L., 1758 и серой крысы *Rattus norvegicus* Bercehouth, 1769, представляющих два других рода семейства Muridae (Челомина, 1993а).

На рис. 3 представлена картина электрофоретического разделения яДНК грызунов гидролизованной рестриктазой EcoRI. Наиболее яркая полоса электрофореграммы представляет семейство повторяющихся последовательностей длиной 1,85 тыс. пн (тпн), обнаруженное ранее в геномах лесных и полевых мышей Польши и Британских островов и признанное родоспецифичным (Cooke, 1975; Brown, Dover, 1981). Согласно данным денситометрии, на его долю в геноме каждого проанализированного нами вида приходится примерно одинаковое количество ДНК — около 2,2 %, что предполагает копийность, равную $(8,8-9,7) \times 10^4$, так как размер генома лесных и полевых мышей составляет 8,3—9,1 пг (Gamperl et al., 1982).

В отличие от родоспецифичного EcoRI-повтора количество диспергированных повторяющихся последовательностей длиной 1,35 тпн, идентифицированных в геномах лесных мышей Западной Европы (Cooke, 1975), а также домашней мыши и крыс (Brown, Dover, 1979, 1981; Hirning et al., 1989; Gamperi et al., 1982; Miklos et al., 1980) (т. е. специфичных, очевидно, для таксона более высокого ранга), в разных видах отличается. В геномах *S. flavicollls*, *S. sylvaticus*, *S. uralensis* оно максимально и составляет 1,8—2,0 %, *A. peninsulae* — значительно ниже (не выше 0,5 %), а у *A. speciosus* и *A. agrarius* этот повтор не обнаруживается вообще или представлен минимальным количеством копий (регистрация которых невозможна из-за ограничений в чувствительности метода). По имеющимся в литературе сведениям (Brown, Dover, 1981), он отсутствует в EcoRI-гидролизатах ДНК *A. mystacinus* (горная малоазийская мышь) и европейских форм *A. agrarius*. Максимальная частота повторяемости 1,35 тпн EcoRI-последовательности составляет $(3-6) \times 10^4$ на геном. В яДНК других гры-



Dover, 1981) и $(2,4-5) \times 10^4$ - у крыс (Miklos et al., 1980), что также согласуется с результатами наших исследований *M. musculus* и *R. norvegicus*.

Описанные выше диспергированные повторы являются членами MIF-I-семейства грызунов (Brown, Dover, 1981), входящего в состав класса PNEs — длинных диспергированных последовательностей со свойствами мобильных повторяющихся элементов генома. Члены MIF-I-семейства включают протяженные области, высоко гомологичные (более 60 %) Kpn-семейству человека и приматов, с которыми грызуны разделились примерно 70 млн лет назад (Singer et al., 1983). Таким образом, диспергированные EcoRI-повторы представляют относительно консервативную часть повторяющейся ДНК грызунов. Поэтому отличия в количественном содержании 1,35 тпн последовательности можно рассматривать как свидетельство значительной степени дивергенции видов «Arodemus». Поскольку европейские формы — наиболее молодые среди лесных мышей (что общепризнано) — содержат большее число копий 1,35 тпн повтора, возможно существование обратной корреляции между количеством данной EcoRI-последовательности и эволюционным возрастом видов. Этот вывод находит косвенное подтверждение в результатах исследований, полученных Т. Нишиока (Nishioka, 1989), показавшим, что у домовых мышей при инвариантности MIF-I-семейства доля EcoRI-фрагментов ДНК значительно варьирует и достигает максимального значения у филогенетически наиболее молодых представителей таксона.

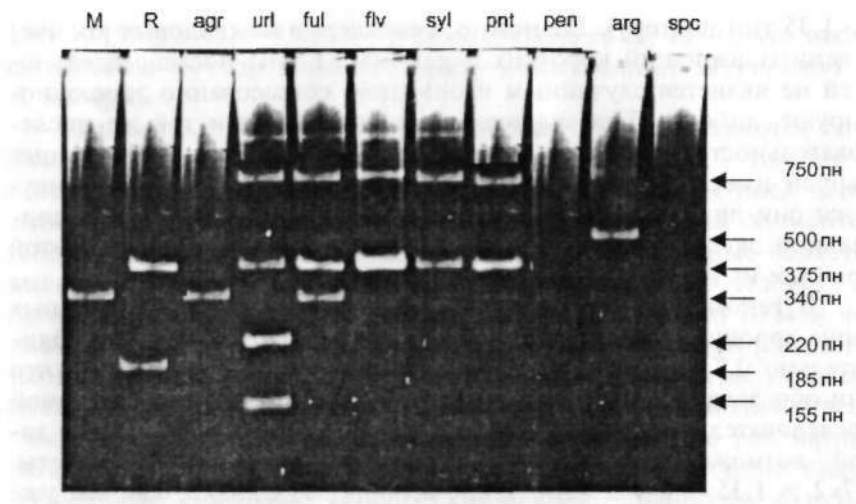
Неожиданным было обнаружение в геноме *A. speciosus* EcoRI-фрагмента длиной около 2,5 тпн, который не был зарегистрирован в других исследованных видах. Примечательно, что повтор такой же протяженности (принадлежащий к классу PNEs) образуется при EcoRI-гидролизе генома крыс (Miklos et al., 1980).

В яДНК лесных и полевых мышей помимо длинных обнаруживаются короткие EcoRI-последовательности (рис. 3,Б), две из которых — 450 пн и 500 пн — описаны ранее (Cooke, 1975; Brown, Dover, 1981; Hirning et al., 1989). Показано, в частности, отсутствие гомологии этих компонентов с диспергированной 1,35 тпн EcoRI-ДНК (Brown, Dover, 1981). Содержание ДНК в 450 пн фрагментах у всех видов примерно одинаково (как и 1,85 тпн), в то время как в 500 пн фрагментах оно заметно варьирует (подоб-

но 1,35 тпн повтору). Возможно, совпадение межвидовых количественных вариаций коротких и длинных EcoRI-последовательностей не является случайным и они либо согласованно эволюционируют, либо вообще включены в состав одной и той же последовательности. Наиболее мелкие EcoRI-фрагменты ДНК лесных мышей имеют протяженность примерно 210 пн. Идентифицируются они лишь при высоких нагрузках образца в геле (либо длительной экспозиции при фотографировании). Очевидно, по этой причине их не зарегистрировали ранее.

В геномах *A. peninsulae* и *A. agrarius* кроме перечисленных выше хорошо дифференцируются полосы ДНК размером приблизительно 0,7 тпн и 1,15 тпн или 1,1 тпн. Можно допустить, что они образовались путем расщепления длинной диспергированной последовательности дополнительным EcoRI-сайтом. В пользу такой возможности говорят простые арифметические расчеты: $0,7 \times 2 = 1,35$; $0,7 + 1,15 = 1,1 + 0,7 = 1,85$. Однако, как мы уже отмечали, есть основание думать, что по крайней мере 1,35 тпн EcoRI-последовательности геномов мышевидных грызунов, напротив, могут иметь тенденцию к потере EcoRI-сайтов. Далее, нельзя было исключать, что короткие EcoRI-фрагменты могут содержать в себе сатДНК. Например, известно, что рестриктаза EcoRI-выщепляет из генома крыс сателлит, состоящий из двух субповторов (Witney, Furano, 1983). В гидролизатах обнаруживаются два основных (размером 92+93 пн и 185 пн) и несколько минорных дискретных фрагментов ДНК, некоторые из которых совпадают по молекулярной массе с EcoRI-ДНК «Apodemus».

При обработке яДНК грызунов эндонуклеазой HindIII (рис. 4), которая из геномов крыс и лесных мышей выщепляет «легкую» сатДНК (Cooke, 1975), между европейскими видами *S. sylvaticus* и *S. flavicollis* выявляются количественные различия, которые не были отмечены другими авторами (Cooke, 1975; Hirning et al., 1989). Содержание HindIII-сателлита в геноме *S. sylvaticus* составляет 10—11 %, *S. flavicollis* — не менее 15 %. Как и у конспецифичных западных форм (Cooke, 1975; Hirning et al., 1989), в гидролизатах яДНК обоих видов сателлит представлен повтором длиной 375 пн, а также его ди-(750 пн) и тримером (1,1 тпн). Ядерная ДНК *S. uralensis* отличается отсутствием последовательности в 750 пн (т. е. димера) и расщеплением большей части мономерных звеньев на фрагменты длиной 155 пн и 220 пн,



представляющая, возможно, последовательности сатДНК. Интересно, что такой же компонент наблюдается в геноме домового мыши (см. рис. 4). В гидролизатах яДНК *A. speciosus* HindIII-дискретные полосы не обнаружены.

В целом HindIII-сатДНК исследованных видов грызунов отличалась по длине звена повторяемости, его расщеплению одноименной нуклеазой рестрикции, количественному содержанию, размеру представленного наибольшим числом копий мультимера. Последнее обстоятельство важно потому, что (при отсутствии отбора на длину) наиболее старые виды должны обладать более протяженными мультимерами, так как со временем накапливается число мутаций в базисных единицах повторяемости, что ведет к потере определенных сайтов рестрикции и, таким образом, к увеличению длины вышеперечисленных последовательностей тандема. В таком случае можно предполагать следующую очередность формообразования грызунов: *R. norvegicus*—*A. peninsulae**S. sylvaticus*, *S. uralensis*, *S. flavicollis*. При этом отрезок времени, разделяющий дифференциацию *A. peninsulae* с *R. norvegicus*, должен быть значительно меньше времени дивергенции *A. peninsulae* с европейскими видами лесных мышей (при условии равных скоростей молекулярной эволюции генома у представителей Muridae).

Таким образом, в целом по характеру рестрикционных картин ДНК лесных и полевых мышей можно условно разделить по крайней мере на две группы: «tatfws0-подобную (*sylvaticus*, *flavicollis*, *uralensis*, *peninsulae*) с яркими EcoRI-и HindIII-фрагментами ДНК и «Mm5»-подобную (*speciosus*, *agrarius*) со слабо выраженными полосами либо их отсутствием. Первая группа вполне могла бы представлять одну филогенетическую линию, что, однако, весьма сомнительно относительно второй.

Сопоставление результатов EcoRI-и HindIII-анализа яДНК грызунов указывает на существование положительной корреляции между содержанием HindIII-сатДНК и 1,3 тпн EcoRI-диспергированного повтора. Это может быть обусловлено особенностями молекулярных механизмов видообразования в данной таксономической группе и/или согласованной эволюцией сателлитных и диспергированных последовательностей. Последнее не противоречит современным представлениям об эукариотическом геноме как единой динамичной системе с эволюционно подвижными и стабильными участками и природе диспергированных последова-

тельностью как мобильных генетических элементов. Кроме того, с позиций концепции Р. Бриттена и Д. Конне о происхождении сателлитов (Britten, Kohne, 1968) полученные данные можно рассматривать как свидетельство того, что по мере «старения» видов уменьшалось количество HindIII-сатДНК и, напротив, видообразование связано с амплификацией последовательностей HindIII-сателлита. Если такая закономерность действительно имела место, то ранее всех от филетической линии лесных мышей отделилась *A. peninsulae*, затем с небольшим интервалом — *S. sylvaticus*, *S. uralensis* и *S. flavicollis*, что вполне увязывается с предыдущими выводами, основанными на сравнении длин HindIII-мультимеров. Исключение составляет *Rattus norvegicus*, время дифференциации которой по этой схеме приближается к b^1 , *uralensis* и *S. sylvaticus*. Тем не менее такая ситуация более предпочтительна ввиду значительно меньшего эволюционного возраста *R. norvegicus* по сравнению с *A. peninsulae* (Громов, Баранова, 1981). Следовательно, тесты на длину мультимера и количество сатДНК приемлемы для таксонов различных рангов, вместе они могут быть использованы, очевидно, только в пределах родственных видов. Положение *A. speciosus* и *A. agrarius* в этой системе остается неясным из-за отсутствия у них 375 пн HindIII-сатДНК.

Итак, несмотря на принадлежность лесных мышей к таксону относительно невысокого ранга со стабильным хромосомным числом основного набора ($2n=48$), геномы их достоверно различаются, даже у таких, как *S. sylvaticus* и *S. flavicollis* — видов, наиболее близких между собой по ряду критериев (Cooke, 1975; Hirning et al., 1989; Межжерин, Зыков, 1991). Дивергировали не только эволюционно более мобильные сателлитные последовательности, но и относительно консервативная часть генома — диспергированные повторы.

Высокий уровень дифференциации сравниваемых повторов может быть мотивирован рядом причин: 1) значительными различиями в эволюционном возрасте таксонов (например, формирование европейских и азиатских видов лесных мышей произошло в различные геологические периоды?" (Громов, Баранова, 1981); 2) высокими темпами молекулярной (в отличие от консервативной фенотипической) эволюции геномов грызунов (Бирштейн, 1987); 3) гибридным происхождением некоторых видов; о такой возможности (относительно *A. sylvaticus*) указано в рабо-

тах Н.И. Лариной (1962); 4) полифилетическим происхождением рода, так как есть сведения, что монофилетические группы млекопитающих имеют консервативный характер эволюции повторяющейся ДНК (Arnason et al., 1984); 5) особенностями механизмов молекулярной эволюции в таксонах со стабильным кариотипом, поскольку разнохромосомные виды близкородственных грызунов обладают межвидовым консерватизмом распределения сайтов рестрикции в часто повторяющейся фракции ДНК (Miklos et al., 1980; Челомина и др., 1990).

Подчеркнем, что, сравнивая близкородственные виды с существенно различным эволюционным возрастом, мы имеем уникальную возможность наблюдать за результатами эволюции отдельных семейств повторяющейся ДНК, что, безусловно, в целом приближает нас к пониманию механизмов функционирования эукариотического генома. Например, полученные данные позволяют считать, что эволюционный возраст лесных мышей прямо пропорционален длине HindIII-мультимера и обратно пропорционален количеству как HindIII-сайтов ДНК, так и диспергированного 1,35 тпн EcoRI-повтора. Этот вывод (в части, касающейся диспергированного повтора) свидетельствует о сохранении общих принципов молекулярной эволюции геномов различных видов и родов Muridae.

Таким образом, у нас не оставалось сомнений в перспективности выбранного метода и в том, что для достоверности таксономических и филогенетических выводов по группе «Apodemus» — проблема и на сегодняшний день актуальная — необходимо использовать более широкий круг рестриктаз, тем более что хромосомы лесных и полевых мышей относительно богаты С-гетерохроматиновыми областями (Gamperl et al., 1982). Выявление и анализ таксоноспецифичных последовательностей должны, по нашему мнению, предварять такие исследования, поскольку они позволяют определить общую структуру исследуемого таксона и наметить дальнейшее направление работ.

1.2. Молекулярно-генетическое типирование трех представителей транспалеарктических лесных мышей

Далее мы сравнивали геномы лесных мышей из естественных изолятов горных (Кавказ) и островных (Япония) популяций:

S. ponticus, *S. fulvipectus* и *A. argenteus* соответственно (Челомина и др., 19956). Ареал *S. fulvipectus* помимо Северного Кавказа включает также Причерноморье и часть Средней Азии, в то время как два других вида эндемичны для указанных мест (Воронцов и др., 1992; Corbet, 1978). Кавказская мышь *S. ponticus* и степная мышь *S. fulvipectus* (синонимы: *falzfeini* и, вероятно, *chorassanicus*) в отличие от *A. argenteus*, первоописанной как самостоятельный вид еще в 1845 г. (Corbet, 1978), стали известны значительно позже, причем как подвиды *S. sylvaticus* (Воронцов и др., 1992). Их видовой статус был окончательно подтвержден относительно недавно в результате широкомасштабных исследований с применением комплекса генетических методов (биохимических, кариологических, морфометрических), проводимых с целью таксономической ревизии «*Apodemus*» (Воронцов и др., 1988а,б, 1989, 1992; Боесков и др., 1990; Межжерин, Зыков, 1991). Ранее молекулярная организация генома указанных видов не изучалась, поэтому для получения необходимых видовых характеристик (молекулярно-генетического типирования) мы использовали рестриктазы EcoRI-и HindIII, дающие (как показано выше) таксонспецифические картины расщепления, соответственно, длинных диспергированных и коротких tandemно организованных сателлитных последовательностей ДНК.

Согласно вышеизложенным результатам можно выделить несколько вариантов расщепления яДНК изученных видов рестриктазой EcoRI, узнающей длинные диспергированные повторы ДНК: 1) одна родоспецифичная полоса с молекулярной массой 1,85 тпн (*A. agrarius*, *A. mystacinus*, *A. peninsulae*); 2) две полосы, «родоспецифичная» и «семействоспецифичная» длиной 1,35 тпн, характеризующая также домовых мышей рода *Mus* и крыс рода *Rattus* (*S. sylvaticus*, *S. flavicollis*, *S. uralensis*); 3) две полосы — родоспецифичная и размером приблизительно 2,5 тпн (т. е. примерно такая же, как в геноме серой крысы) (*A. speciosus*). Такое разделение подразумевает высокую дифференциацию сравниваемых видов, отражающую в большой мере таксономическую структуру группы лесных и полевых мышей.

Наши результаты (см. рис. 3) показали, что *S. ponticus* имеет второй из перечисленных вариант расщепления. К нему можно было бы отнести и *A. argenteus*, но у данного вида вместе с диспергированными 1,85 тпн и 1,35 тпн EcoRI-последовательностями

«^{вб1}шепляется тандемно организованный повтор, образующий мультимерную «лестницу» фрагментов ДНК с молекулярной массой, кратной примерно 240 пн, не наблюдаемую в геномах других представителей исследуемой группы видов. Степная мышь *S. fulvipectus* в этом отношении является не менее уникальной. В гидрсуззатах ДНК этого вида содержатся три дискретных фрагмента длиной 2,5 тпн, 1,85 тпн и 1,35 тпн, что дает основание выделить его в отдельный, четвертый тип EcoRI-расщепления. Примечательно, что самый протяженный из EcoRI-повторов присутствует в геномах видов *{S. fulvipectus, A. speciosus}*, формирующих краевые популяции, причем в противоположных точках ареала транспалеарктических лесных мышей. В связи с этим хотелось бы отметить еще один любопытный факт. У некоторых самок *A. (s)chorassanicus* (вероятный синоним *S. fulvipectus*) зоологи отмечали черты, присущие подроду *Alsomys*, включающему восточнопалеарктические виды. Возможно, это явление не случайно, и *S. fulvipectus* представляет собой переходную (промежточную) форму между азиатскими и европейскими видами лесных мышей. Может быть, это тривиальный случай редкой аномалии, как предполагал А.И. Аргиропуло (1946). Во всяком случае в совокупности, мы думаем, эти сведения могут быть полезными при решении вопроса о происхождении и путях расселения этого сложного комплекса видов.

Интересно, что вышеописанные результаты имеют сходство с данными (Джиллеспи и др., 1986), указывающими, что количество Kpn-семейств диспергированной ДНК (относящихся, как и EcoRI-последовательности генома лесных мышей, к классу PNEs) в геномах приматов варьирует от 1 до 3. Причем увеличение числа Kpn-полос коррелирует с последовательной дифференциацией от общего предка низших, высших обезьян и человека. Эти факты могут быть свидетельством сохранения общих принципов организации и эволюции длинных диспергированных повторов в различных филетических линиях млекопитающих. Основываясь на них, можно прийти к логическому выводу, что наиболее молодым из западнопалеарктических видов лесных мышей Должна быть *S. fulvipectus*. Такое заключение находится в соответствии с некоторыми данными биохимического исследования представителей *Apodemus* и *Sylvaemus* (Межжерин, Зыков, 1991). Однако ясно, что проведение прямых аналогий между приматами

и грызунами проблематично вообще, а в частности — по причине того, что нами не доказана принадлежность 2,5 тпн EcoRI-повтора мышей к MIF-I-семейству грызунов. Действительно, как было установлено позже с помощью ядерных и митохондриальных генов (см. гл. 2 в наст. работе), этот вид не может считаться самым молодым среди *Sylvaemus*. Кроме того, как следует из нижеизложенного, 2,5 тпн EcoRI-повтор в геномах лесных мышей, вероятнее всего, представляет фракцию сатДНК.

Анализ низкомолекулярных EcoRI-фрагментов (см. рис. 3) подтверждает близость кавказских и европейских видов лесных мышей: в геномах *S. fulvipectus* и *S. ponticus* идентифицируются те же 450 пн и 500 пн повторы. Японская лесная мышь *A. argenteus* выделяется присутствием яркой полосы ДНК длиной примерно 240 пн, представляющей, судя по наличию мультимеров этого фрагмента, tandemно организованный повтор сатДНК. Помимо этого отличительной чертой *A. argenteus* является наличие трех, а не двух, как у остальных видов лесных мышей, EcoRI-полос в области 500 пн (впрочем, дополнительная полоса, видимо, представлена сатДНК).

По характеру расщепления яДНК рестриктазой HindIII-исследованные виды лесных мышей (Cooke, 1975; Hirning et al., 1989; Челомина, 1993а) можно было условно разделить на две гетерогенные группы. Первая, включающая восточноазиатскую (*A. peninsulae*) и европейские (*S. sylvaticus*, *S. flavicollis*, *S. uralensis*) виды лесных мышей, содержит, подобно *Rattus norvegicus* (Witney, Furano, 1983), HindIII-сателлит с 375 пн мономером. Ко второй группе относятся виды (*A. agrarius*, *A. speciosus*, *A. mystacinus*), сатДНК которых не выщепляется эффективно рестриктазой HindIII. Рестриктаза HindII у типизируемых видов также выявила высокую генетическую дифференциацию (см. рис. 4). Как и в случае с EcoRI, *S. ponticus* оказалась наиболее близкой к европейским видам лесных мышей. В геноме обнаруживаются те же дискретные фрагменты длиной 375 пн, 750 (375x2) тпн и 1,1 (375x3) тпн. Отличает ее лишь минорный компонент длиной приблизительно 550 пн. В этих условиях анализа в геноме *S. fulvipectus* можно идентифицировать такие же фрагменты ДНК. Однако в отличие от европейских видов лесных мышей сатДНК как *S. fulvipectus*, так и *S. ponticus* на электрофоретических картинах представлены главным образом тримерами. А это может быть свиде-

тельством их большего эволюционного возраста. Интересно также, что низкомолекулярный компонент ДНК *S. fulvipectus* состоит из двух фрагментов: 375 пн (как у всех лесных мышей) и 330 пн (как у полевой мыши). Таким образом, уникальная по характеру EcoRI-гидролиза ДНК *S. fulvipectus* отличается среди лесных мышей и по типу расщепления рестриктазой HindIII, что в свою очередь подтверждает возможность коэволюции диспергированных и сателлитных последовательностей ДНК лесных мышей, которую мы обсуждали выше, с одной стороны, и дает основание для выделения этого вида в плане внутриродовой таксономии, с другой. Кроме этого наши данные (в частности, о сатДНК *S. fulvipectus*) укладываются в представления некоторых зоологов о возможном участии в видообразовательных процессах лесных и полевых мышей межвидовой гибридизации. Такая гипотеза была выдвинута В.Г. Гептнером (1940) и подтверждена дальнейшими работами Н.И. Лариной (1962) и К.М. Завадского (1968).

Apodemus argenteus, подобно *A. agrarius* и *A. speciosus* (Cooke, 1975), не имеет ярких дискретных HindIII-полос в высокомолекулярной области спектра (см. рис. 4), но содержит минорный повтор из 550 и 500 пн дуплета, что отличает его от сравниваемых кавказских видов, и в еще большей степени — от европейских лесных мышей. Сателлитная ДНК *A. argenteus* имеет регулярные сайты для EcoRI (см. рис. 3). Поразительно, что период чередования у них такой же, как у домового мыши *Mus musculus*, — около 240 пн (Brown, Dover, 1980), а не 375 пн, как у других представителей «*Apodemus*» (Cooke, 1975; Hirning et al., 1989; Челомина, 1993а). Следовательно, геномы лесных мышей могут иметь не только «*Rattus*»-*mn*, как это было известно до наших исследований, но и «A/m5»-тип сегментации сатДНК, что соответствует выделению «*Rattus*»-*n* «Mш»-типа рестрикционных картин яДНК (см. выше). Таким образом, вышеперечисленные свойства ставят *A. argenteus* в особое положение среди исследованных видов. Возможно, эта мышь генетически более близка к другим южноазиатским формам *Apodemus*, но информация о молекулярной организации их геномов до сих пор крайне ограничена, а сведения о характере ПДРФ яДНК отсутствуют вообще. Руководствуясь общими рассуждениями об эволюции сатДНК в целом и таксонспецифических последовательностей лесных мышей в частности, можно предположить, что *A. argenteus* — наиболее молодой из изучен-

ных пока азиатских видов, так как в геноме этой мыши одинаково высоко представлены оба семейства диспергированных повторов (длиной 1,85 тпн и 1,35 тпн), а также сатДНК, обладающая, судя по рестрикционным картинам, низким рестрикционным полиморфизмом. Такой вывод, однако, не вполне согласуется с филогенией лесных и полевых мышей, сконструированной по данным других маркеров (см. гл. 2 в наст. работе).

Полученные характеристики ПДРФ яДНК по сравнению с традиционными морфологическими и биохимическими признаками (маркерами) стабильны внутри вида, что является определенным преимуществом при диагностике новых форм. Таким образом, нами было проведено молекулярно-генетическое типирование видов «*Apodemus*», подтверждающее их видовой статус. Геномы изученных грызунов имеют особенности расщепления как сателлитных *HindIII*-, так и диспергированных *EcoRI*-последовательностей, что свойственно для высоко дивергировавших форм. В отличие от генетико-биохимических (Межжерин, Зыков, 1991), наши результаты свидетельствовали в пользу большего генетического родства *S. ponticus* с *S. sylvaticus*, а не с *S. fulvipectus*. В сатДНК *A. argenteus* нами обнаружен необычный для лесных мышей тип сегментации — как у домового мыши, причем с помощью не *HindIII*-, а *EcoRI*-рестриктазы. Полученные данные не исключали участия в видообразовании процессов гибридизации между различными формами лесных мышей.

1.3. «Мм5»-тип сегментации сатДНК малой японской мыши *Apodemus argenteus*

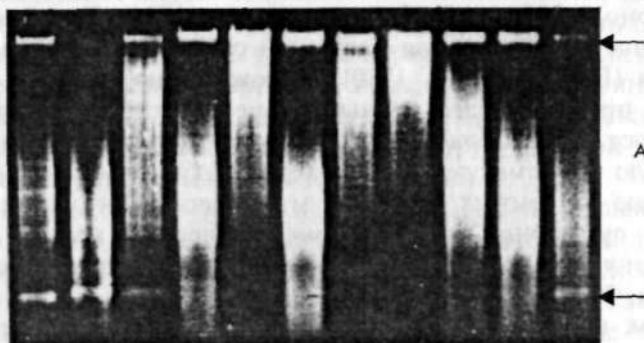
Как было показано, последовательности сатДНК большинства видов северопалеарктических лесных мышей расщепляются эндонуклеазой рестрикции *HindIII*-по типу сатДНК крыс рода *Rattus* (Cooke, 1975; Hirning et al., 1989; Челомина, 1993а; Челомина и др., 1995). Они состоят из 375 пн единиц повторяемости и у разных видов отличаются количеством копий, протяженностью мультимера, расщепляемостью рестриктазами (Челомина, 1993а). Сателлитная ДНК южноазиатской лесной мыши *A. argenteus* (известной за ее грациозность под названием «гейша») является исключением, так как расщепляется рестриктазой *EcoRI*, а не

HindIII (1), причем на серию фрагментов с молекулярной массой примерно $px240$ пн (2) (Челомина и др., 1995). Такой же тип сегментации характерен для мажорной сатДНК домовых мышей рода *Mus* (Brown, Dover, 1980). К сожалению, данные о сатДНК других представителей лесных мышей Южной Палеарктики отсутствуют. Чтобы более подробно охарактеризовать эту не совсем обычную (в смысле сегментации) для геномов «*Apodemus*» фракцию тандемных повторов, мы продолжили рестрикционный анализ суммарной яДНК японской лесной мыши, используя 13 эндонуклеаз рестрикции и технику двойного гидролиза (Челомина, 2000).

Как видно (рис. 5), почти все использованные рестриктазы способны образовывать высокомолекулярные фрагменты ДНК, формирующие при электрофорезе в агарозных гелях яркие дискретные полосы. Их молекулярная масса превышает 10 тпн, слегка варьируя в различных гидролизатах, а *MspI*-фрагменты четко подразделяются на две подфракции. Примечательно, что такие же блоки образует полспецифическая ДНК некоторых позвоночных (Газарян, Тарантул, 1983). Рестриктаза *Sau3a*, в отличие от других использованных ферментов рестрикции, гидролизует суммарную яДНК почти исключительно на низкомолекулярные фрагменты с одной ярко выраженной полосой длиной приблизительно 240 пн. Высокомолекулярные *Bai3a*-блоки регистрируются лишь в неполных или частичных гидролизатах.

В зоне средней электрофоретической подвижности в большинстве гидролизатов обнаруживаются отдельные слабосветящиеся в УФ полосы яДНК с молекулярной массой, кратной примерно 240 пн. Для наиболее выраженных из них она составляет 2,7 тпн (240×11), 1,4 тпн (240×6), 1,2 тпн (240×5) в *BgIII*-, *BsuRI*- и *HinfI*-гидролизатах соответственно, что может означать их принадлежность к сатДНК. Ни одна из перечисленных рестриктаз в условиях полного гидролиза не формирует, подобно *EcoRI*, тандемную лестницу повторов. Не идентифицируется она и в частичных либо неполных гидролизатах яДНК этих рестриктаз. Однако в трех вариантах расщепления из десяти (*CspBI*-, *Sau3a-H* *BgIII* — гидролизаты) низкомолекулярные фрагменты представлены главным образом одной яркой дискретной полосой длиной 230-240 пн, т. е. имеющей размер звена повторяемости тандема. Подвижность этих фрагментов несколько различается. Практически

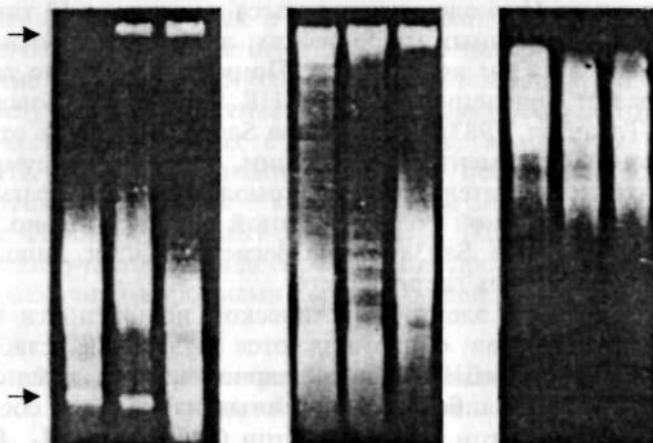
C S Bg Bs Ms Hf T Hd Mv A S'



S/E C/E A/E

C/A M/A C/Mv

S/Mv S/C S/A



B

полностью она совпадает, с одной стороны в Sau3a и BglII гидролизатах (Баи3а-тетрануклеотид входит в BglII-сайт узнавания), а с другой — в Csp6I-H EcoRI-гидролизатах (не имеющих общих последовательностей узнавания). Разница в размерах получаемых фрагментов, по нашим оценкам, находится в пределах 10 пн. Таким образом, вполне вероятно, что повторяющиеся последовательности сатДНК *A. argenteus* маркируются кроме EcoRI рестриктазами Csp6I, BglII и Sau3a. Позже было показано, что эта фракция имеет также регулярные сайты для рестриктазы DraI, имеющие ту же периодичность (примерно 230 пн) (Fukushi et al., 2001).

Чтобы доказать принадлежность выявляемых повторов к сателлитной фракции, мы провели повторную обработку проанализированных гидролизатов ДНК рестриктазами EcoRI, Sau3a, Csp6I, AluI и MvaI (всего 25 вариантов). Результаты двойного гидролиза (см. рис. 5) показали следующее.

1. Во всех гидролизатах высокомолекулярные фрагменты яДНК расщепляются рестриктазой Sau3a с образованием яркой 240 пн полосы; ни одна другая рестриктаза подобным эффектом не обладает. Следовательно, все высокомолекулярные блоки включают в себя Sau3a-поВтор, который организован тандемно либо в кластере с другими последовательностями.

2. Использование рестриктазы AluI приводит к образованию серии хорошо дифференцированных фрагментов яДНК типа «лестницы», отличающихся по молекулярной массе в разных вариантах гидролиза, т. е. нуклеазоспецифичные высокомолекулярные фрагменты обладают определенной внутренней структурой и, возможно, имеют между собой хотя бы частичную гомологию.

3. Повторная обработка Csp6I-H Баи3а-гидролизатов рестриктазой EcoRI-практически никак не влияет на количество формирующихся 240 пн фрагментов, хотя EcoRI-мультимеры частично гидролизуются как Csp6I, так и Sau3a. В то же время совместный Зай3а+Сзрбгидролиз приводит к ослаблению интенсивности 240 пн фрагмента (частично сохраняется лишь электрофоретический эквивалент Csp6I-поВТора), а также формированию нескольких «Новых» дискретных фрагментов ДНК. Таким образом, вполне вероятно, что между 240 пн EcoRI-, Csp6I-H Баи3а-повторами существует гомология, причем последние два могут даже представлять одни и те же участки.

4. Интенсивность свечения высокомолекулярных фрагментов яДНК в двойных гидролизатах выше, чем в обычных, что свидетельствует о специфичности различных крупнощепящих рестриктаз к разным последовательностям. Другими словами, высокомолекулярные фрагменты рестрицированной яДНК могут принадлежать к различным подсемействам повторяющихся последовательностей сателлитной фракции.

Суммируя полученные результаты, можно сказать, что сатДНК *A. argenteus* организована в протяженные, около 10 тпн, блоки, состоящие из 240 пн БаиЗа-последовательностей. Часть из них имеет регулярно повторяющиеся Dral-, а также СврбБили EcoRI-сайты, характеризующие, вероятно, различные подсемейства последовательностей сатДНК. Аналогичные черты организации известны у относительно консервативной альфоидной ДНК человека и приматов, нуклеотидная последовательность которой имеет высокое сходство с последовательностью сатДНК крыс рода *Rattus*. Альфа-сателлит организован в крупные блоки, состоящие из различных типов мономеров. Большая их часть переводится в 170 пн фрагменты рестриктазой HindII, и только 30 % гидролизуется EcoRI с образованием мультимерного ряда фрагментов. Кластеры различных типов мономеров альфа-сатДНК приматов локализуются на различных участках хромосом. Высокое сходство нуклеотидной последовательности альфа-сатДНК приматов и сатДНК крыс рода *Rattus* (Gupta, 1983) может быть косвенным доказательством в пользу возможного родства с ними и сатДНК лесных мышей. Учитывая данное обстоятельство, можно предположить, что отдельные подсемейства (т. е. нуклеазоспецифичные последовательности) сатДНК *A. argenteus* тоже имеют хромосомспецифическую локализацию. Однако результаты флуоресцентной гибридизации in situ (FISH) показали, что большинство Dral-фрагментов сатДНК *A. argenteus* гибридизуется с перичентромерными С-блоками (содержащими гетерохроматин) всех хромосом, включая половые. Более того, Dral-фрагмент включал последовательности, аналогичные центромерной ДНК (CENP-B, обладающей 17 пн белоксвязывающим мотивом) человека. В геномах млекопитающих центромеры CENP-B играют ключевую роль в организации структуры хроматина, хотя в их отсутствие некоторые хромосомы используют другие резервные белки, чтобы завершить митоз. Вместе с тем Dral-фрагмент сатДНК *A. argenteus*

не дал ни одного положительного сигнала при гибридизации с ДНК других видов лесных и полевых мышей (*A. peninsulae*, *A. agrarius*, *A. semotus*, *S. sylvaticus*), а также домашней мыши *Mus musculus*, указав таким образом на строгую видоспецифичность и высокую дивергенцию с геномами сравниваемых видов (Fukushi et al., 2001). Уникальность сатДНК малой японской лесной мыши подтверждается характером флуоресценции С-блоков. Для большинства прицентромерных аутосомных С-гетерохроматиновых областей после окрашивания кинакрин-ипритом наблюдается постепенное нарастание интенсивности свечения — так называемая замедленная флуоресценция (delayed fluorescence). Подобный эффект не был отмечен ни для одного из других видов *Apodemus* или *Sylvaemus* (Fukushi et al., 2001).

Если опираться на данные палеозоологии о последовательном отделении от общей филетической линии Muridae родов *Mus*, *Apodemus* и *Rattus* (Громов, Баранова, 1981), то одним из примечательных предположений, вытекающих из имеющихся результатов, будет то, что в геномах «*Apodemus*» сатДНК может быть представлена как последовательностями-«предшественниками», так и последовательностями-«потомками», поскольку имеет оба варианта сегментации: характерный для более старого рода *Mus* и более молодого, чем «*Apodemus*», рода *Rattus*. Это хорошо согласуется с гипотезой существования в геномах млекопитающих библиотеки сателлитных последовательностей ДНК (Salser et al., 1976). Кроме того, данное обстоятельство может быть, как мы обсуждали выше, аргументом в пользу возможности полифиетического происхождения рода лесных и полевых мышей. Хотя такая возможность не исключается и при одновременной дифференциации родов мышевидных грызунов (Vophomme et al., 1985), предполагающей наличие общих предковых форм, а следовательно, и общих последовательностей-«предшественников» для сатДНК.

Высокая представленность в геноме, особенности расщепления (т. е. мультимерная лестница EcoRI-фрагментов с равномерным распределением в ней ДНК, один и тот же период чередования сайтов для ряда рестриктаз), а также преимущественная локализация сатДНК в центромерных областях хромосом (Yoshida et al, 1975), характерная для эволюционно молодых сателлитных последовательностей ДНК (Macgregor, Session, 1986), являются сви-

детельством недавних амплификационных событий в гомологичных повторах *A. argenteus* и дают основание считать эту фракцию генома эволюционно молодой. Если принять во внимание возможность существования коррелятивных связей между возникновением сатДНК и видообразованием, можно полагать, что эволюционный возраст *A. argenteus* относительно невелик. Однако данный вывод, как мы уже отмечали, противоречит результатам анализа филогенетических отношений лесных и полевых мышей по ряду молекулярных признаков. С нашей точки зрения, данное противоречие (по крайней мере, отчасти) снимается, если предположить для японской мыши, например, гибридогенное происхождение. Почвой для такого предположения могут быть кариологические особенности данного вида, а именно наличие в его кариотипе не 48, как у всех лесных мышей, а 46 хромосом (Yoshida et al., 1975). Известно, что хромосомный полиморфизм может индуцироваться межвидовой и подвидовой гибридизацией таксонов, отличающихся кариотипическим числом. Закрепиться в эволюции могла только одна кариоморфа. Но вероятнее всего, *A. argenteus* — эволюционно молодой вид на древней филогенетической ветви «*Apodemus*».

Таким образом, в сравнении с данными других авторов (Cooke, 1975; Brown, Dover, 1979; Hirning et al, 1989) наши результаты предполагают существенные отличия в организации генома лесных мышей в целом и его особого компонента — сатДНК. Возможно, последовательности с «Л/«5»-вариантом расщепления сатДНК представлены в геномах других видов лесных мышей. Фрагменты одинаковой электрофоретической подвижности (по сравнению с сатДНК японской лесной мыши), но дающие слабое свечение в УФ, обнаруживаются также в геномах некоторых видов исследуемой группы (см. выше). В таком случае различия в количестве «*Mus*»-подобной сатДНК должны быть результатом независимой эволюции гомологичных последовательностей в геномах каждого вида при их видообразовании и дивергенции. Чтобы понять значение вариантов сегментации сатДНК, необходимо применение более тонких и чувствительных методов исследования (в том числе секвенирования), а также изучение распределения этих вариантов между близкими видами более полно, непременно используя малоизученные формы Южной Палеарктики.

Кроме того, полученные данные указывают на корреляцию типов сатДНК с географическим распространением видов лесных и полевых мышей: первый, «У?о«5»-вариант сегментации сатДНК, характеризует западные виды северопалеарктической фауны, в то время как «М«л»-вариант является отличительной чертой южнопалеарктической лесной мыши. Возможно, хотя и маловероятно, что данное генетическое отличие *A. argenteus*, эндемика Японии, выражает адаптивную стратегию вида (спекуляции такого рода широко известны), обусловленную его островной изоляцией. Во всяком случае, совершенно очевидно, что вышеописанные результаты свидетельствуют о высокой генетической дифференциации лесных и полевых мышей, отражающей в значительной мере их сложную таксономическую структуру, и подчеркивают их генетическое разнообразие, что неоднократно отмечалось авторами биохимических исследований данной группы грызунов (Павленко и др., 1984; Межжерин, Зыков, 1991).

1.4. Дифференциация GC-богатых сайтов рестрикции в часто повторяющейся ДНК

Как следует из вышеизложенного, с помощью эндонуклеаз рестрикции EcoRI и HindIII в геномах лесных и полевых мышей были выявлены и частично охарактеризованы таксонспецифичные EcoRI-и HindIII-последовательности ДНК. Дальнейший анализ указанных повторов на примере большого числа видов позволил нам разделить животных на две группы: «*Rattus*»-w «*Mus*»-подобные. Полученные данные предполагали определенную последовательность формообразования мышей типа «*Rattus*» (предположительно одна филетическая линия) и отмечали высокий Уровень дивергенции видов (не укладывающихся в одну филетическую линию), представляющих тип «*Mus*». Для уточнения генетических дистанций между этими видами и реконструкции филогенетических отношений был продолжен сравнительный рестрикционный анализ яДНК шести видов лесных и полевых мышей (*A. peninsulae*, *A. agrarius*, *S. sylvaticus*, *S. flavicollis*, *A. speciosus*, *S. uralensis*), а также домашней мыши *M. musculus* и серой крысы & • *norvegicus* (Челомина, 1993б). Использовали эндонуклеазы рестрикции, специфичные к GC-богатым сайтам (MspI, BspRI, MvaI),

syl

pen



← 30 pM

полагаем, последовательность эволюционных событий у песчанок можно представить следующим образом: 1) мутация в области МДГ (всплеск активности вследствие эндо-или экзогенного воздействия), 2) амплификация короткой последовательности ДНК (как результат действия МДГ), 3) метацентрические разрывы (следствие амплификации), 4) видообразование (по причине хромосомных разрывов, нарушивших «привычное» расположение генов — соседство нуклеотидных последовательностей) (Челомина и др., 1990). Подобно малоазийской песчанке *A. peninsulae* — кариологически наиболее полиморфный среди лесных мышей вид, так как он содержит до 24 добавочных (В) хромосомы (Борисов, 1990 а-г). Это самые высокие значения не только для группы лесных и полевых мышей, но и для млекопитающих в целом (Прокофьева-Бельговская, 1986). В данном случае логичным было бы связать появление В хромосом с 30 пн сатДНК. Добавочные хромосомы содержатся в геномах еще пяти других видов «*Apodemus*» (*S. sylvaticus*, *S. jlavicolis*, *S. mystacinus*, *A. argenteus* и *A. agrarius*). Но их числа там значительно меньше (Картавцева, 2002). Около 2 тыс. видов животных и растений (среди них 35 видов млекопитающих, представленных главным образом грызунами) имеют добавочные хромосомы. Многие авторы связывают их появление с адаптацией организма к воздействию внешних экологических и эпизоотических факторов (Бекасова, 1980; Картавцева, 2002; Jones, Rees, 1982; Vujosevic, Blagojevic, 1995), но их функция и природа остаются до конца невыясненными.

Использование молекулярно-генетических методов в исследовании хромосом дало очень важную информацию о молекулярной природе и механизмах формирования В-хромосом. Методом AP-PCR выявлены отличия между геномами *A. flavicollis*, имеющими В хромосомы и без них. Авторы предполагают, что у желтогорлых мышей образование добавочных хромосом связано с событиями амплификации или мутаций в последовательностях ДНК (Tanic et al., 2000). Этому разделу исследований посвящен подробный обзор (Рубцов, Бородин, 2002), мы ограничимся кратким изложением лишь некоторых результатов, полученных главным образом на восточноазиатской лесной мыши *A. peninsulae*. 1. Отличительной особенностью В-хромосом всех животных является почти полное отсутствие функциональных генов и высокая насыщенность мобильными генетическими элементами, способ-

ными перемешаться по геному и размножаться как в составе хромосомной ДНК, так и вне ее. Однако некоторые В-хромосомы лесной мыши содержат гены, отвечающие за синтез рибосомальной РНК. 2. Примечательно, что проба ДНК одного плеча В-хромосомы одинаково окрашивает оба плеча. Хромосомы с идентичными плечами называют изохромосомами, они почти никогда не встречаются в норме, но возникают в раковых клетках и в клетках, культивируемых *in vitro*. 3. В геноме *Apodemus peninsulae* выделяют три класса повторяющейся ДНК: один локализован в прицентромерных районах В-хромосом, аутосом и двух районах половых хромосом, второй составляет основную массу плеч В-хромосом и в значительно меньших количествах содержится в А-хромосомах, третий обнаруживается только на концах некоторых В-хромосом. 4. Предполагается, что В-хромосомы лесной мыши возникли не одновременно, наиболее молодые (самые мелкие) состоят в основном из центромеры, которые могут быть основой для дальнейшей эволюции, и в конечном счете — формирования А-хромосом. Наличие В-хромосом в геномах разных видов лесных и полевых мышей означает, что они унаследовали от общего предка не сами добавочные хромосомы, а способность их создавать *de novo* (цит. по: Рубцов, Бородин, 2002).

Рестриктаза *MspI* продуцирует в геномах грызунов (кроме *A. agrarius*) некоторое количество дискретных фрагментов ДНК без видимой тандемной организованности. Во всех исследованных образцах количество ДНК в рестрикционных фрагментах незначительно, исключая *A. peninsulae*, где оно составляет около 4—6 % генома. *MvaI* гидролизует ДНК всех грызунов с образованием широкого спектра четко дифференцированных фрагментов, представляющих значительную часть геномов (в среднем 5—10 %), что может быть свидетельством их принадлежности к сателлитной фракции. Это справедливо по крайней мере в отношении *M. musculus*, в гидролизатах ДНК которой присутствуют два тандемно организованных компонента: основной, содержащий до 20 % ДНК (т. е. максимально для мышевидных грызунов), и минорный, включающий не более 1 % ДНК. Первый из мономеров длиной 240 пн, второй — примерно 130 пн, что соответствует существующим представлениям о сатДНК *M. musculus* (Brown, Dover, 1980). Интересно, что в цитируемой работе сатДНК выщепляли рестриктазой *Avail*, специфичной к последовательности

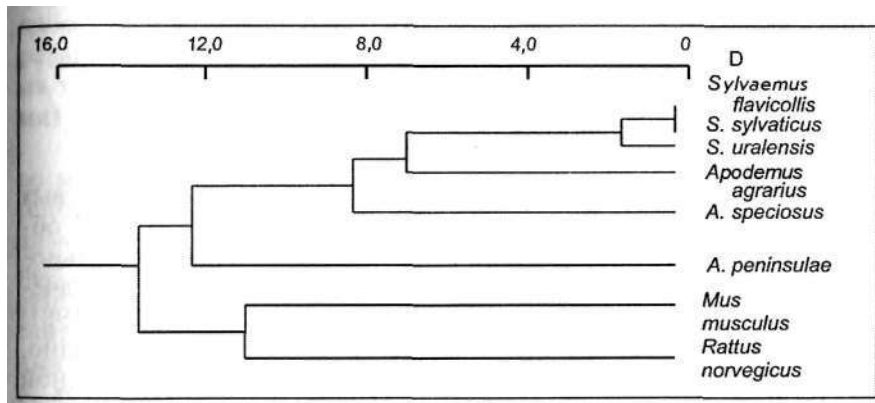
GGT/ACC (сравните с сайтом для Mval: CCA/TGG). Это предполагает наличие в сатДНК домовой мыши GC-богатых блоков протяженностью не менее 8 нуклеотидов: GGT/ACCA/TGG или GGT/ACCCCA/TGG, напоминающих коровую последовательность минисателлита Джеффриса (GGGCAGGAXG) генома человека (Jeffreys et al., 1985) и гомологичный ему повтор генома лисицы (консенсусная последовательность — GGTCACCT) (Потапов и др., 1990), а также коротких шпилечных структур. Инвертированные повторы (идентичные, но с противоположной ориентацией, формирующие при отжиге ДНК так называемые шпильки) обнаружены при секвенировании высокоповторяющейся BspRI-последовательности генома хищных и, видимо, характерны для сатДНК вообще (Потапов и др., 1990).

Сопоставление результатов исследования часто повторяющейся ДНК Muridae, полученных в нашей работе и в ранее опубликованных исследованиях других авторов (Brown, Dover, 1980; Witney, Furano, 1983; Gupta, 1983), с данными анализа BspRI-повтора генома лисицы, имеющего сложную иерархическую структуру (Потапов и др., 1990), позволяет полагать, что молекулярные механизмы эволюции в этих филогенетических линиях млекопитающих (хищные и грызуны) имеют сходный характер. Так, аналогично приведенному примеру можно допустить, что сатДНК «Apodemus» произошла от разных последовательностей отдельных семейств повторов, эволюционирующих на более ранних этапах обособленно и сохранившихся в таком состоянии только в геномах *Mus*, где они организованы в 240 пн и 130 пн сатДНК. Действительно, суммарная длина этих мономеров равна размеру звена повторяемости сатДНК лесных мышей, а также крыс. Кроме того, сателлитный мономер генома крыс и лесных мышей расщепляется на два субповтора, причем гомология мономеров в сатДНК крыс составляет всего около 60 % (Witney, Furano, 1983). Вместе с тем секвенирование одного из субповторов обнаруживает значительное сходство с аналогичными структурами таких высоко дивергировавших видов, как зеленая мартышка и человек (Gupta, 1983). Наше предположение поддерживается палеонтологическими данными, указывающими на больший эволюционный возраст *Mus* по сравнению с «Apodemus» и *Rattus*, поскольку (согласно выявленной для хищников закономерности) внутренняя структура высоких повторов у эволюционно молодых видов

должна быть более сложной (Потапов и др., 1990). Наконец, это хорошо совместимо с уже упомянутой нами гипотезой существования в геномах грызунов «библиотеки» относительно простых последовательностей, амплификация которых может привести к образованию новой сатДНК (Salser et al., 1976).

Наиболее близкими среди исследованных видов оказались *S. sylvaticus* и *S. flavicollis*, между которыми мы смогли зарегистрировать лишь количественные различия (по яркости дискретных полос ДНК). Тесные отношения между этими видами предполагают также результаты кариологических (Hirning et al., 1989) и некоторых биохимических исследований (Engel et al., 1973). Из остальных видов к этим двум ближе *S. uralensis* ($D=0,9\%$), далее всего — *A. peninsulae* ($D=12,53\%$). Самое высокое значение генетических дистанций обнаруживается между азиатскими видами *A. peninsulae* и *A. speciosus* ($D=13,58\%$). Полевая мышь немного более удалена от азиатских ($D=8,46\%$), чем от европейских ($D=6,16\%$) форм лесных мышей. Если принять во внимание, что за 1–2 млн лет эволюции геномы близкородственных видов *Mus* дивергировали на 1,5% (Suzuki et al., 1990), то, экстраполируя данные, можно подсчитать, что *A. peninsulae* могла появиться примерно 10 млн лет назад, *A. agrarius*, *A. speciosus* — 6–7 млн, *S. uralensis* — около 1 млн лет, а *S. sylvaticus* с *S. flavicollis* — еще позже, т. е. формирование лесных мышей проходило в широком временном диапазоне. Это вполне согласуется с выводами (Suzuki et al., 1990; Межжерин, Зыков, 1991) авторов, изучающих лесных и полевых мышей с помощью других методических подходов молекулярной генетики и биохимии, а также с данными палеозоологии (Громов, Баранова, 1981). Дивергенция представителей «*Apodemus*» с *M. musculus* и *R. norvegicus* составляет 12,69% и 13,20% соответственно. Столь высокие значения генетических дистанций в некоторых вариантах сравнения дает лишь *A. peninsulae* (которая также больше других видов дивергировала с домашней мышью и крысой).

Располагая виды грызунов в порядке их дивергенции с эволюционно наиболее молодыми и генетически близкими в данной группе видами (*S. sylvaticus* и *S. flavicollis*), мы находим, что формирование *A. peninsulae* приходится на период между дифференциацией от общего филогенетического ствола Muridae домашней мыши *M. musculus* и серой крысы *R. norvegicus*. Привлекательность



ференциация видов «Apodemus» с *M. musculus* и *R. norvegicus*, представляющих два других рода семейства Muridae, подтвердили адекватность использованного нами метода. Особое внимание, с нашей точки зрения, заслуживает тот факт, что дифференциация GC-сайтов в часто повторяющейся ДНК грызунов совпадает с дифференциацией семейства Muridae на роды, т. е. GC-богатые последовательности, очевидно, могут служить для мышевидных грызунов своеобразным эволюционным маркером на молекулярном уровне при анализе таксонов высокого ранга.

1.5. Особенности рестрикционного полиморфизма ДНК европейских и азиатских видов

Из вышеизложенного ясно, что в геномах лесных и полевых мышей с помощью эндонуклеаз рестрикции EcoRI и HindIII обнаруживаются сателлитные и диспергированные последовательности ДНК, различающиеся как по количественным, так и по качественным характеристикам (Cooke, 1975; Brown, Dover, 1981; Gamperi et al., 1982; Hirning et al., 1989). Вместе с тем очевидно, что использованные рестриктазы оставляют неисследованной значительную часть геномов. Не удалось, в частности, достигнуть эффективного расщепления сатДНК *A. agrarius* и *A. speciosus*. Применение ферментов, специфичных к GC-богатым сайтам рестрикции (MvaI, MspI, BspRI), в полной мере также не разрешило эту проблему, но все же позволило более подробно охарактеризовать фракцию часто повторяющейся ДНК видов, идентифицировать специфичный для *A. peninsulae* BspRI-сателлит, вычислить межвидовые генетические дистанции. Дендрограмма, построенная по этим данным, в целом отражала тот же характер филогенетических отношений, какой был описан на основании результатов анализа ПДРФ рДНК (Suzuki et al., 1990), хотя отличалась от нее в деталях.

Мы продолжили изучение геномов лесных и полевых мышей методом анализа ПДРФ суммарной яДНК для получения более полных сведений об их организации, а также с целью уточнения межвидовых генетических различий и реконструкции филогенетических связей (Челомина, 1996). Предпочтение отдавали тетра-нуклеотидным рестриктазам, компенсирующим отчасти недостаточность используемого числа данных ферментов высокой встре-

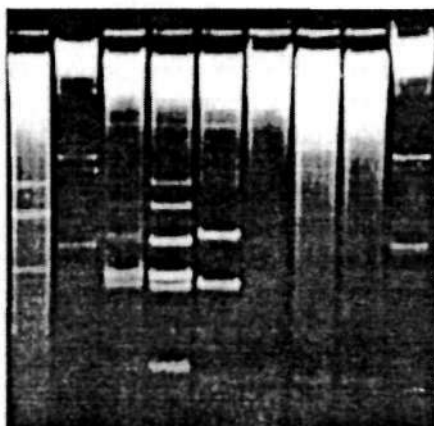
чаемостью их сайтов рестрикции. Были выбраны рестриктазы AluI, TagI, CspBI и BglII, места узнавания которых (AGCT, TCGA, GTAC и AGATCT соответственно) могли произойти от одного тетрануклеотида путем мультипликаций и инверсий. Поскольку один из сайтов включен в блок нуклеотидов, узнаваемый нуклеазой HindIII-(AAGCTT), которая маркирует сатДНК лесных мышей, мы надеялись более подробно охарактеризовать именно сателлитную фракцию генома — общепризнанный молекулярный маркер в эволюционных и филогенетических исследованиях. Такой набор ферментов позволял нам также апробировать дифференцированный подход в выборе рестриктаз (узнающие сайты с четырьмя типами азотистых оснований по сравнению с GC-специфичными) для изучения сателлитной фракции генома грызунов.

Нуклеаза AluI гидролизует ДНК лесных мышей на множество мелких фрагментов, образуя яркие дискретные полосы лишь в геномах европейских видов. Эти дискретные полосы, по всей видимости, включают в себя последовательности ДНК, гомологичные ранее выявленному в геномах лесных мышей HindIII-сателлиту, так как AluI-блок нуклеотидов входит в состав HindIII-сайта рестрикции (Cooke, 1975). Количество сатДНК в дискретных AluI-и HindIII-фрагментах коррелирует, увеличиваясь в ряду *S. sylvaticus*, *S. uralensis* и *S. flavicollis*. На картинах рестрикции сатДНК *S. sylvaticus* представлена в основном одним AluI-фрагментом длиной 375 пн, а *S. flavicollis* и *S. uralensis* — тремя, значительно более яркими, с размерами 375, 200, 175 пн и 350, 200, 150 пн соответственно. В геноме *S. uralensis* регистрируется низкомолекулярный компонент, состоящий примерно из 20—30 пн. Таким образом, HindIII-повторы сатДНК как *S. sylvaticus*, так и *S. uralensis* (в отличие от *S. flavicollis*) практически полностью расщепляются рестриктазой AluI. Однако строго фиксированные AluI-сайты характерны только для сатДНК последних двух видов: один сайт на последовательность сатДНК *S. flavicollis* (200+175 пн фрагменты) и два сайта — *S. uralensis* (200+150+20 пн Фрагменты). Следовательно, и внутригеномный полиморфизм, и число AGCT-сайтов в повторе сатДНК увеличиваются в ряду *S. flavicollis*, *S. uralensis*, *S. sylvaticus*, т. е. находятся в обратной Пропорциональной зависимости с количественными характеристиками данной фракции (см. выше) и, очевидно, прямо пропорциональны эволюционному возрасту.

Alul-фрагменты ДНК других видов распределяются в основном диффузно, образуя дискретные полосы умеренной интенсивности. В Alul-гидролизатах *A. peninsulae* дифференцируется несколько неярких полос, имеющих электрофоретические аналоги в геномах других видов, а также видоспецифичный фрагмент длиной более 1 тпн. Хорошо видны два фрагмента длиной 230 и 290 пн в гидролизатах ДНК *A. speciosus* и один (первый из них) - в ДНК *A. agrarius*. Кроме высокомолекулярной фракции в Alul-гидролизате ДНК домашней мыши идентифицируется видоспецифичная полоса размером примерно 240 пн. У *R. norvegicus*, напротив, помимо специфичных присутствуют общие с лесными мышами Alul-фрагменты (длиной 420, 375 и 290 пн).

Нуклеаза TagI (TCGA) выявляет в геномах европейских видов лесных мышей серию ярких дискретных фрагментов ДНК (рис. 8), также принадлежащих к сателлитной фракции (Brown, Dover, 1979). Их размер для *S. sylvaticus* с *S. flavicollis* составляет 375, 300, 160 и 150 пн (дуплет) и примерно 75 пн, а также 220 пн (*S. sylvaticus*) и 210 пн (*S. flavicollis*), что согласуется с имеющимися в литературе сведениями (Brown, Dover, 1979). Большая часть сатДНК *S. uralensis* представлена двумя фрагментами размером примерно 220 и 150 пн, как и в HindIII-гидролизатах (Cooper, 1975). В целом содержание ДНК в этих фрагментах достаточно высоко и соответствует значениям, полученным при кариологической оценке доли сатДНК в геномах лесных мышей (Gampert et al., 1982). В гидролизате ДНК *S. uralensis* регистрируется также низкомолекулярный фрагмент с чуть большей, чем у *S. sylvaticus* с *S. flavicollis*, подвижностью — 70 пн. Такой же компонент обнаруживается в TagI-гидролизатах ДНК полевой и азиатских лесных мышей. Кроме него *A. speciosus*, подобно европейским *S. sylvaticus* с *S. flavicollis*, содержит 160 пн фрагмент. Остальной набор рестрикционных фрагментов ДНК полевой и азиатских лесных мышей различен, яркие полосы в их рестрикционных картинах отсутствуют. Такой результат в отношении *A. peninsulae* был неожиданным, так как сатДНК данного вида расщепляется нуклеазой HindII по типу европейских лесных мышей (см. выше). Картина TagI-расщепления ДНК *R. norvegicus* оказалась ближе к таковой европейских видов как по интенсивности, так и по размерным характеристикам рестрикционных фрагментов (375, 290 и 170 пн).

R λ syl flv url pen arg spc λ



← 375 пн

← 210-220 пн

← 150-160 пн

← 75 пн

← 70 пн

Нуклеаза BglII (AGATCT) в геномах всех видов выщепляет дискретные фрагменты, хорошо дифференцированные по отношению к основной массе ДНК, что делает вероятной и их принадлежность к сателлитным последовательностям. Об этом же свидетельствуют размерные характеристики. В гидролизатах ДНК европейских лесных мышей явных отличий нет, хорошо различим один фрагмент с молекулярной массой около 740 пн, что равно длине HindIII-димера. Восточноазиатские лесная и полевая мыши дают практически один и тот же профиль расщепления. В их геномах обнаруживаются по три фрагмента с молекулярными массами примерно 560, 280 и 190 пн (что кратно размеру HindIII-тримера 2, 4 и 6 раз соответственно). *Apodemus speciosus* занимает промежуточное положение между европейскими лесными мышами и *A. agrarius* с *A. peninsulae*. В ее геноме образуется три фрагмента с молекулярными массами 740, 370 и 240 пн, т. е. совпадающими с размерами сатДНК *R. norvegicus* и *M. musculus*.

В целом картины рестрикции ДНК европейских видов лесных мышей между собой очень схожи, т. е. имеют низкий межвидовой ПДРФ, что подтверждает их генетическую близость. Присутствие в гидролизатах преимущественно ярких дискретных полос ДНК свидетельствует о низкой внутригеномной гетерогенности сателлитных последовательностей, что, вероятно, является следствием их относительной эволюционной молодости. Обращает внимание, что дискретные полосы ДНК *S. sylvaticus* в Alul-и C\$р61-гидролизатах значительно слабее, чем можно ожидать исходя из данных количества сатДНК в геноме этого вида (Cooke, 1975; Hirning et al., 1989). Вероятной причиной такого расхождения результатов может быть гетерогенность сатДНК европейской лесной мыши, обнаруженная при ее плавлении. Оказалось, что сатДНК *S. sylvaticus* состоит из двух фракций, характеризующихся разными температурами плавления. Причем одна из них высокогомологична, а другая — существенно дивергировавшая (Cooke, 1975). Возможно, эти особенности связаны с локализацией сатДНК *S. sylvaticus* не только в центромерных, как у *S. flavicollis* (сатДНК которой состоит из высокогомологичных последовательностей) (Cooke, 1975), но и теломерных участках хромосом (Hirning et al., 1989), где, по мнению авторов, локализуются эво-

люционно более старые и более дивергировавшие последовательности сатДНК (MacGregor, Session, 1986). Совокупность имеющихся данных позволяет предположить, что при относительном постоянстве скоростей молекулярной эволюции и отсутствии селективного отбора последовательностей указанная выше очередность видообразования (*S. sylvaticus*, *S. uralensis*, *S. flavicollis*) должна отражать последовательную дифференциацию лесных мышей от общего филогенетического предка.

Рестрикционные картины ДНК азиатских мышей имеют более высокие межвидовые отличия и не содержат ярких дискретных полос. И то и другое логично связать с высоким эволюционным возрастом указанных видов, а также с возможностью полифилетического происхождения восточнопалеарктических лесных и полевых мышей, которые определяют повышенный меж- и внутривидовой ПДРФ повторяющейся ДНК, приводящий, в свою очередь, к снижению дискретности картин рестрикции. Для *A. speciosus*, однако, отсутствие ярких электрофоретических полос может быть связано и с небольшим количеством сатДНК в геноме, так как кариотип этого вида отличается самым низким среди лесных и полевых мышей содержанием С-окрашиваемого гетерохроматина (Gamperl et al., 1982). Дивергенция «*Apodemus*» с *R. norvegicus* и *M. musculus*, представляющих внешнюю группу, по характеру картин рестрикции ДНК сомнений не вызывает.

Генетическая обособленность азиатских и европейских видов очевидна: генетические дистанции (D) между ними равны 9,49 %, причем средний уровень дивергенции геномов европейских лесных мышей (D=1,29 %) значительно ниже, чем азиатских (D=7,05 %). Интересно, что полевая мышь дивергировала с европейскими видами лесных мышей в значительно большей мере (D=9,17 %), чем с азиатскими (D=5,33 %). Достоверно более высокие значения генетических дистанций получены при сравнении лесных мышей с *R. norvegicus*: D=12,5 %, что почти в A раза больше, чем между видами «*Apodemus*», для которых D=6,88 %. Обращают внимание относительно низкие значения генетических дистанций *A. agrarius* с *A. peninsulae* и *A. speciosus* (D=5,88 и 4,77 % соответственно) и умеренные — между *A. peninsulae* и *A. speciosus* (D=7,05 %), что контрастирует с результата-

ми, полученными при анализе повторяющейся ДНК с GC-богатыми сайтами рестрикции (см. выше). Тем не менее удивительно постоянной остается средняя величина генетических дистанций между видами (для сравнения: 6,8 % — по ПДРФ ATGC-сайтов, 7,12 % - по ПДРФ GC-сайтов суммарной яДНК и 7,0 % - по ПДРФ рДНК) (Suzuki et al., 1990).

Обработка полученных данных методом UPGMA (Sneath, Sokal, 1973) подтверждает кластеризацию видов на две группы: европейскую и азиатскую (куда также входит полевая мышь) (рис. 9). Аналогичен характер дендрограмм, построенных по результатам генетико-биохимического анализа кодирующих последовательностей ДНК лесных мышей (Межжерин, Зыков, 1991). В противоположность этому дендрограммы, сконструированные по результатам ПДРФ рДНК (Suzuki et al., 1990) и участков повторяющейся ДНК, содержащих GC-богатые сайты рестрикции, демонстрируют более равномерное и последовательное ответвление видов от общего филогенетического ствола, а четкая кластеризация на две группы в них отсутствует. Однако все варианты

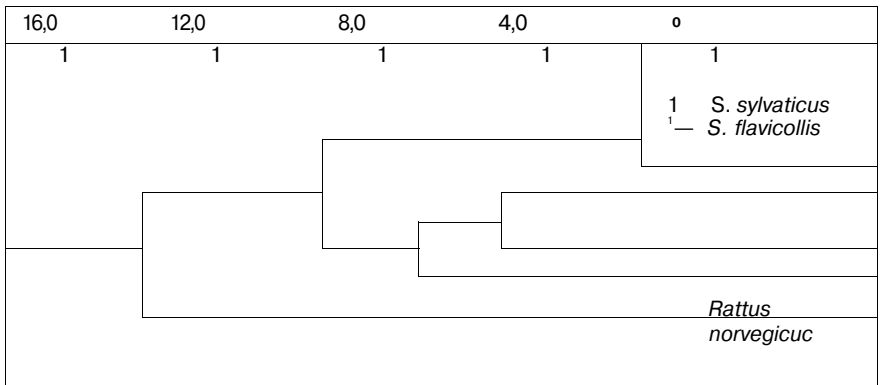


Рис. 9. UPGMA-дендрограмма генетического сходства лесных и полевых мышей по данным ПДРФ суммарной яДНК (по: Челомина и др., 1995б). D — генетические дистанции по Нею. Белым цветом обозначены европейские (род *Sylvaemus*), черным — азиатские (род *Apodemus*) виды

Fig. 9. UPGMA dendrogram of genetic similarity of wood and field mice based on total nDNA RFLP (from: Chelomina et al., 1995b. - Russian). D — Nei's genetic distances. White colour designates european species (the genus *Sylvaemus*), and black — asian ones (the genus *Apodemus*)

перечисленных гипотетических схем имеют общую черту: они свидетельствуют о значительных различиях в эволюционном возрасте двух исследуемых групп грызунов, наиболее молодыми из которых определяются европейские, а старыми — азиатские виды. Чтобы легче было представить значимость подобного рода различий, заметим, что время дивергенции *Homo sapiens* от общей филетической линии приматов оценивают в 3–4 млн лет (Кимура, 1985), тогда как филетические ветви азиатских и европейских форм лесных мышей, согласно данным ПДРФ суммарной яДНК, разделились более 8 млн лет назад, а общий возраст всего комплекса видов составляет около 10 млн лет.

Поскольку анализируемая здесь фракция повторов представляет в основном сатДНК, мы можем предполагать адаптивную и эколого-географическую направленность наших результатов. Однако авторы цитированного выше биохимического исследования (Межжерин, Зыков, 1991), получившие сходные дендрограммы, не склонны связывать свои результаты с адаптивными стратегиями видов лесных и полевых мышей. Расхождения в принципе и деталях схем, моделирующих систему фено-и филогенетических связей видов «*Apodemus*», вызывают особый интерес, так как несут, по-видимому, определенный биологический смысл, понять который в полной мере пока не представляется возможным. Несомненной остается целесообразность использования для соответствующих реконструкций комплекса генетических подходов в получении экспериментальных данных, а также различных способов их математической обработки.

Итак, в результате проведенных исследований с применением АГТС-специфичных рестриктаз было достигнуто эффективное (с образованием дискретных полос) расщепление яДНК всех перечисленных видов, дающее дополнительные сведения о фракции частых повторов. Выявлены различия по сатДНК между наиболее близкими формами, а также некоторые особенности геномов западных и восточных видов Северной Палеарктики и их высокая дифференциация между собой. Данные свидетельствуют о целесообразности дифференцированного подхода в выборе эндонуклеаз для рестрикционного анализа яДНК мышевидных грызунов.

1.6. Генетическая дифференциация лесных мышей Кавказа

Непредсказуемость эволюции, конечно, не абсолютна. Одни детали эволюционного процесса предвидеть невозможно, тогда как другие выявляются с большей или меньшей достоверностью, хотя эта достоверность никогда не бывает, по-видимому, абсолютной.

Л.П. Татаринев

До недавнего времени систематика лесных мышей Кавказа оставалась практически неразработанной. Сложность ситуации усугублялась низкой морфологической дифференциацией ювенильных форм (Аргиропуло, 1946), а также возможностью межвидовой гибридизации (Гептнер, 1940; Ларина, 1962; Завадский, 1968). Существовало также мнение о принадлежности всех лесных мышей данного региона к одному виду (Воронцов и др., 1988а,б). Открытие в 1952 г. *A. microps*=*S. uralensis* (Громов, 1981) послужило толчком к пересмотру систематики лесных мышей. Ревизия мелких грызунов Кавказа и Закавказья, осуществленная с привлечением морфологических и генетических (кариология, аллозимный анализ) методов исследования, внесла определенную ясность в данную проблематику и позволила выделить среди всего разнообразия лесных мышей 4 формы видового статуса: *S. ponticus*, *S. fulvipectus*, *S. uralensis* и *S. hyrcanicus* (Воронцов и др., 1988а,б, 1989, 1992; Межжерин и др., 1992). Для трех из них мы провели молекулярно-генетическое типирование (Челомина и др., 1995б), результаты которого свидетельствовали о дивергенции сравниваемых геномов на уровне «хороших» видов, и обнаружили новые варианты расщепления родоспецифичных повторяющихся последовательностей яДНК. В частности, применение рестриктазы EcoRI, узнающей диспергированные повторы, выявило наличие трех фрагментов яДНК длиной 2,5, 1,85 и 1,35 тпн в геноме *S. fulvipectus*, по сравнению с 1 или 2 из них в геномах других видов (Cooke, 1975; Brown, Dover, 1981; Hirning et al., 1989; Челомина, 1993а). Рестриктаза HindIII в геноме этого же вида обнаружила повторяющиеся последовательности, маркирующие сатДНК как лесных, так и полевых мышей, что ранее (для од-

ного генома) также не отмечалось (Cooke, 1975; Hirning et al., 1989; Челомина, 1993а).

В целях дальнейшего изучения повторяющейся ДНК, а также для уточнения межвидовых филогенетических связей трех видов лесных мышей Кавказа: эндемичной понтийской *S. ponticus*, степной *S. fulvipectus* и малой *S. uralensis* — был проведен более детальный анализ ПДРФ яДНК и сопоставление характера, а также степени их генетической дифференциации на основе аллозимной, цитогенетической и молекулярно-генетической (т. е. на уровне молекулы ДНК) изменчивости (Челомина и др., 1998б). Рестриктазы *Hinf*I, *Msp*I и *Bsu*RI обнаружили в сравниваемых геномах лишь минорные полосы ДНК, набор которых от вида к виду практически не изменялся. Рестриктазы *Alu*I, *Mva*I и *Csp*6I, специфичные к *Hind*III-сатДНК лесных мышей (см. выше), указали на некоторые межвидовые отличия как по набору рестрикционных фрагментов, так и по количественному распределению между этими фрагментами яДНК (рис. 10). Рестриктаза *Tag*I оказалась специфичной только для сатДНК *S. uralensis*, которую она расщепляет на два ярких дискретных фрагмента. У *S. ponticus* и *S. fulvipectus* *Tag*I-фрагменты примерно такого же размера выражены крайне слабо. Таким образом, *Tag*I-гидролизаты *S. uralensis* яркостью рестрикционных фрагментов ДНК оказались похожими на европейских лесных мышей *S. sylvaticus* и *S. flavicollis*, а их размерными характеристиками — на эндемичный вид Кавказа *S. ponticus*.

В целом рестрикционный анализ геномов лесных мышей Кавказа выявил дополнительные видоспецифичные особенности высокоповторяющейся ДНК, подтвердил видовую самостоятельность сравниваемых видов, а также их безусловное генетическое родство и общность происхождения. Особый интерес представляют результаты, полученные с помощью рестриктазы *Sau*3a, способной хорошо отличать *S. fulvipectus* от всех других представителей *Sylvaemus*. В анализируемых геномах этот фермент выщепляет серию четко дифференцированных фрагментов, которые можно разделить на два отличающихся по яркости мультимерных ряда (субповтора), с молекулярной массой ДНК, кратной примерно 120—130 и 170—180 пн. В геноме *S. fulvipectus* основным является первый из 8aи3a-повторов, а в геномах *S. ponticus* и *S. uralensis* — второй, причем дополнительный компонент у последних содер-

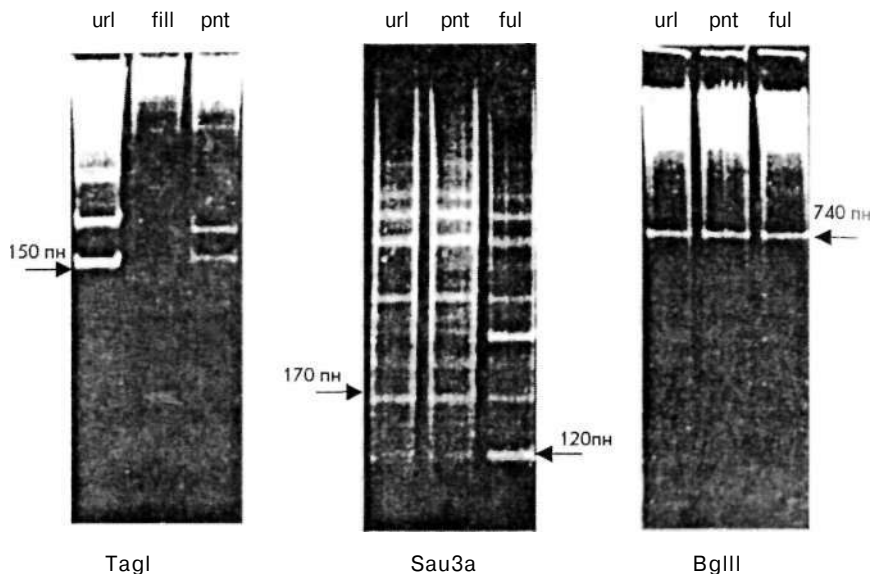


Рис. 10. Электрофорез ДНК лесных мышей Кавказа, гидролизованной разными рестриктазами. Стрелками указаны мономеры основных повторов ДНК. url — *Sylvaemus uralensis*, ful — *S. fulvipectus*, pnt — *S. ponticus* (по: Челомина и др., 1998б).

Fig. 10. Electrophoresis of DNA of Caucasus wood mice digested with different restriction endonucleases. Arrows point to major repetitive DNA monomer, url — *Sylvaemus uralensis*, ful — *S. fulvipectus*, pnt — *S. ponticus* (from: Chelomina et al., 1998b. — Russian)

жится в количествах, зарегистрировать которые удастся лишь в условиях высокой концентрации ДНК в пробе или длительной экспозиции при фотографировании. В то же время в геноме *S. fulvipectus* такой явной диспропорции количественного содержания Sau3a повторов не наблюдается. Профили расщепления яДНК рестриктазой BglII (сайты которой включают Sau3a-тетрануклеотид) не обнаруживают никаких межвидовых отличий. Во всех гидролизатах дифференцируется фрагмент длиной примерно 740 пн, что в 2 раза превышает размер HindIII-последовательности сатДНК, в 4,5 и 6 раз — размер Sau3a субповторов лесных мышей. Такая регулярность в распределении рестрикционных сайтов предполагает принадлежность перечисленных последовательностей к (одной и той же?) фракции сатДНК.

**Генетические дистанции трех видов лесных мышей Кавказа
на различных уровнях организации
Genetic distances for three species of wood mice from the Caucasus
on the different levels of their organization**

| Вид | <i>Sylvaemus ponticus</i> | <i>Sylvaemus uralensis</i> | <i>Sylvaemus fulvipectus</i> | Литературный источник |
|------------------------------|---------------------------|----------------------------|------------------------------|----------------------------|
| <i>I. Sylvaemus ponticus</i> | | 0,287 (0,56) | 0,321 (0,63) | Межжерин, 1990 |
| | | 0,179(0,77) | 0,208 (0,89) | Челомина и др., 19986 |
| | | 0,344 (0,86) | 0,224 (0,56) | Межжерин и др., 1992 |
| | | 0,437 (0,86) | 0,371 (0,73) | Лавренченко, Лихнова, 1995 |
| | | 0,257 (0,78) | 0,229 (0,69) | Там же |
| | | 1,73 (0,54) | 1,78 (0,56) | |
| | | 1,83 (0,45) | 1,54 (0,38) | |
| <i>Sylvaemus uralensis</i> | 64,13 (0,44) | | 0,513 (1,0) | Межжерин, 1990; |
| | | 3,83 (0,31) | 0,232(1,0) | Лавренченко, Лихнова, 1995 |
| | | | 0,402(1,0) | Челомина и др., 19986 |
| | | | 0,503 (1,0) | Там же |
| | | | 0,328 (1,0) | Межжерин и др., 1992 |
| | | | 3,18 (1,0) | Лавренченко, Лихнова, 1995 |
| | | 4,05 (1,0) | Там же | |
| <i>Sylvaemus fulvipectus</i> | 144,85 (1,0) | 25,49 (0,17) | | Челомина и др., 19986 |
| | 12,32 (1,0) | 7,78 (0,63) | | Лавренченко, Лихнова, 995 |

Примечание. Над диагональю: 1-5 и 8-14-я строки — данные изозимного анализа, 6-я и 7-я строки — данные анализа ПДРФ яДНК; под диагональю: 1-я строка — данные морфологических исследований, 2-я строка — кариологические данные. В скобках — относительные значения (вычисленные приравнением к 1 самых высоких абсолютных значений), без скобок — абсолютные (согласно специальным программам для каждого метода исследования).

По сумме данных ПДРФ яДНК были попарно вычислены Межвидовые генетические дистанции (табл. 2), принимали в расчет либо все идентифицируемые полосы яДНК (1-й вариант), либо самые яркие из них (2-й вариант). Оба варианта расчетов показали, что наиболее дивергировала пара *S. uralensis/S. fulvipectus*. Генетические расстояния этих видов по 1-му и 2-му вариантам

подсчета составили соответственно 3,18 и 4,05 %. Данные значения выше полученных при сравнении европейских *S. sylvaticus* и *S. flavicollis* с *S. uralensis*, но существенно ниже тех, которые были получены при сравнении этих же видов с представителями азиатской фауны и последних между собой. Дивергенция *S. uralensis* с *S. ponticus*, а также *S. ponticus* с *S. fulvipectus* значительно ниже, чем у первой пары, и сопоставима с таковой между *S. uralensis*, *S. sylvaticus* и *S. flavicollis*. Для 1-го варианта их генетические расстояния составили соответственно 1,73 и 1,78 %, а для 2-го — 1,83 и 1,54 %, т. е. *S. ponticus* с обоими видами дивергировала почти одинаково.

Обращает внимание, что для разных пар видов расхождения в значениях генетических дистанций по разным вариантам подсчета полос ДНК различны. Для наиболее дивергированной пары *S. uralensis*/*S. fulvipectus* они максимальны и составляют (в относительном измерении) примерно 24 %. Для пары *S. ponticus*/*S. uralensis* и *S. ponticus*/*S. fulvipectus* различия составили соответственно 6 и 16 %, причем последняя пара видов, в противоположность первой и второй, имеет большие генетические дистанции по 1-му варианту подсчета. Наиболее простым объяснением такого расхождения может быть недостаточность используемого количества признаков (рестриционных фрагментов ДНК), обусловленная ограниченным набором рестриктаз. Наиболее заманчивым — разная направленность генетической эволюции различных пар видов: дивергентная у *S. uralensis* с обоими, *S. ponticus* и *S. fulvipectus*, конвергентная — у *S. ponticus* с *S. fulvipectus*. Известно, что конвергенция почти всегда связана со сходными условиями обитания. Экологические предпочтения у понтийской и степной мышей различаются, но их видовые ареалы частично перекрываются. Возможны и другие причины, например, гибридное происхождение, широко дискутируемое ранее (Гептнер, 1940; Ларина, 1962; Завадский, 1968). Однако данное предположение нуждается прежде всего в тщательном анализе митохондриального генома сравниваемых видов (см. гл. 2 наст. работы).

Опираясь на общие положения концепции о структуре и эволюции генома эукариот, а также отдельных его элементов, мы предположили, что 1-й вариант подсчета электрофоретических полос рестрицированной ДНК должен быть более приемлемым для анализа филогенетических связей видов, так как учитывает

различные по биологической значимости, эволюционному возрасту и количественному вкладу в геном повторы. Второй, учитывающий лишь преобладающий у данного вида тип расщепления повторяющейся ДНК, может быть более предпочтителен при анализе степени генетического подобия видов. Позже эти рассуждения нашли полное подтверждение в результатах анализа молекулярной филогении лесных и полевых мышей *Sylvaemus* и *Apodemus* (см. ниже).

Теоретически совершенно очевидно, что молекулярная основа ядерного генома определяет как его хромосомную структуру, так и набор синтезируемых белков. Предполагается также, что для групп видов с постоянным кариотипическим числом, к которым принадлежат лесные и полевые мыши, формообразованию предшествует длительный процесс накопления множественных мелких мутаций, что допускает некоторое отставание хромосомной эволюции от эволюции ДНК на уровне ее нуклеотидной последовательности, а следовательно — от биохимической и морфологической эволюции. Вместе с тем ясно, что генетическая неравнозначность даже мелких мутаций может существенно повлиять на результаты реализации генетической информации. Кроме того, экспериментальные данные позволяют полагать, что характер морфологической эволюции видов детерминируется типом их хромосомной эволюции (Бирштейн, 1987). Замечательным в данной ситуации является то, что, будучи генетически более стабильными, т. е. эволюционно более консервативными, кариологические характеристики сравниваемых видов могут наиболее точно указать последовательность формообразовательных процессов. Это важно потому, что палеонтологические данные свидетельствуют лишь о существовании всех трех форм лесных мышей, соответствующих сравниваемым видам, уже в позднем плейстоцене (Воронцов и др., 1992). В нашем примере, если следовать вышеизложенным рассуждениям, последовательность возникновения видов, очевидно, такова: *S. fulvipectus* *S. uralensis* *S. ponticus*, что согласуется с выводами морфологических исследований данных видов (Лавренченко, Лихнова, 1995). Принимая ее за основу, мы можем сопоставить уровни генетических различий по разным группам признаков (хромосомных, биохимических и молекулярных — т. е. последовательностей ДНК) не только между собой, но и с относительно-временной дивергенцией видов. По-

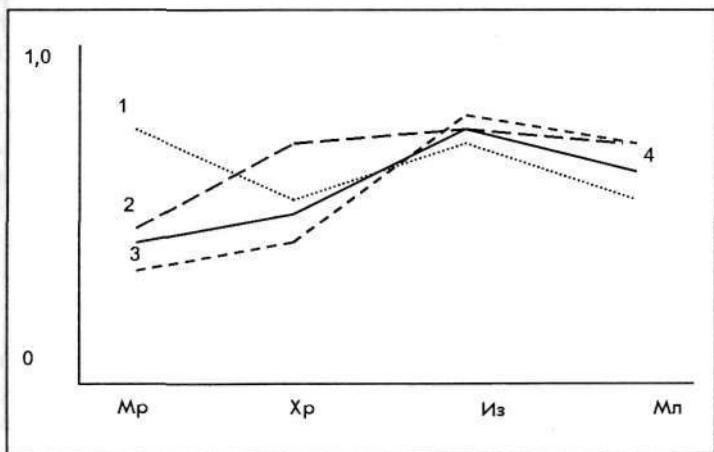
следнее позволяет судить о темпах эволюции видов на разных уровнях их организации.

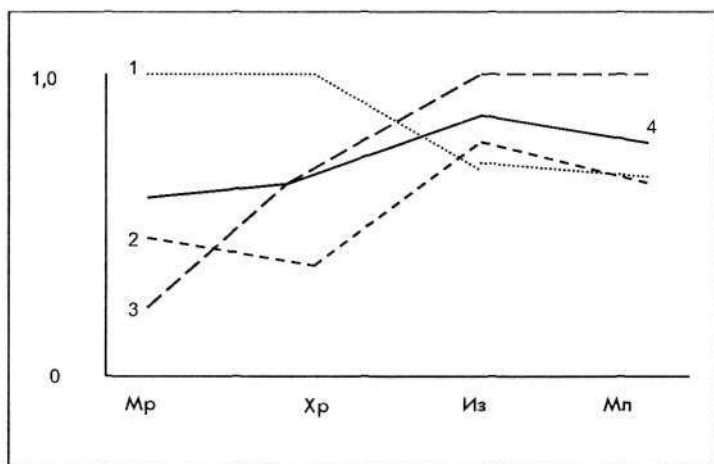
Для удобства сравнения собственных и литературных данных полученные значения генетических дистанций были переведены из абсолютных, которые широко варьируют у разных авторов, в относительные приравниванием самых высоких значений к 1. Такой подход значительно облегчил сопоставление данных, полученных разными генетическими и морфологическими методами. Как видно (табл. 3, рис. 11), степень дифференциации сравниваемой группы видов имеет наименьшие значения на морфологическом уровне (0,54), наибольшие — на изозимном (0,81) и средние — на молекулярном и хромосомном (0,61 и 0,64 соответственно). Для каждого конкретного вида ситуация разная, но в совокупности полученные данные приводят нас к выводу о существовании непростой зависимости между степенью дифференциации каждого вида на разных уровнях организации и его эволюционным возрастом. Так, дифференциация *S. ponticus*, принимаемой нами за самый молодой вид, одинаково высока на морфологическом, хромосомном и изозимном уровнях. При этом молекулярная дивергенция данного вида является самой низкой. Последовательное повышение степени дивергенции вида при переходе от морфологического к хромосомному и изозимному уровням его организации наблюдается лишь для *S. uralensis*. Эволюционно наиболее старый с нашей точки зрения вид — *S. fulvipectus* — имеет равновысокую дивергенцию на всех уровнях генетической ор-

Таблица 3

Средние значения относительной генетической дивергенции каждого вида лесных мышей по данным морфологического (Мр), хромосомного (Хр), изозимного (Из) и молекулярного — ДНК (Мл) анализа (по: Челомина и др., 19986)
Average values of relative genetic divergence for each wood mice species based on morphological (Mр), chromosomal (Хр), isozime (Из) and molecular DNA (Мл) data

| Вид | Мр | Хр | Из | Мл |
|------------------------------|------|------|------|------|
| <i>Sylvaemus ponticus</i> | 0,72 | 0,65 | 0,72 | 0,65 |
| <i>Sylvaemus uralensis</i> | 0,31 | 0,47 | 0,87 | 0,79 |
| <i>Sylvaemus fulvipectus</i> | 0,59 | 0,82 | 0,85 | 0,80 |
| | 0,54 | 0,64 | 0,81 | 0,74 |





Некоторые литературные данные по аллозимной изменчивости в этой группе видов (Межжерин, 1990) подтверждают наши выводы по 1-му варианту вычисления молекулярной дивергенции, указывая, что *S. ponticus* и *S. uralensis* наиболее близки друг другу, другие (Межжерин и др., 1992; Козловский и др., 1990) подчеркивают наибольшее родство *S. ponticus* и *S. fulvipectus*, что согласуется с нашими вычислениями по 2-му варианту подсчета рестрикционных фрагментов ДНК. Но во всех перечисленных случаях *S. uralensis* и *S. fulvipectus* являются наиболее дивергировавшей парой видов, что, видимо, можно считать окончательно установленным фактом для обоих уровней организации генетического материала. Вместе с тем, согласно кариологическим данным, время дивергенции *S. ponticus* и *S. uralensis*, а также *S. uralensis* и *S. fulvipectus* должно быть значительно меньше, чем у пары *S. ponticus/S. fulvipectus*. Степень молекулярной и биохимической дивергенции последней пары, напротив, уступает таковым у первых двух. Следовательно, различные пары видов лесных мышей могут иметь различные скорости молекулярной дивергенции (наиболее высоки они у пары *S. uralensis/S. fulvipectus*) и, может быть, даже разную направленность (у пары *S. ponticus/S. fulvipectus* по сравнению с двумя другими парами видов). Хотя в эволюционных исследованиях основное внимание уделяется анализу степени дивергенции видов, принципиальная возможность конвергентной эволюции не только не отрицается, но имеет экспериментальное подтверждение (Межжерин и др., 1993; Межжерин и др., 1995). Мы разделяем точку зрения цитируемых авторов, что причиной этому может быть неодинаковый генетический потенциал отдельных групп родственных видов. Вместе с тем необходимо отметить важность для эволюции видов истории формирования ареалов, викариантных событий и демографического пресса, чему в настоящее время уделяется все больше внимания (Avice, 1994), а также специфики видообразования. Последнее особенно актуально для изучаемого таксона в связи с возможностью (как мы уже упоминали) гибридогенного формообразования (Ларина, 1962; Завадский, 1968) и полифилетического происхождения.

Таким образом, детальное сопоставление степени сходств и различий видов на различных уровнях их организации указывает, что проблема взаимоотношений между ними является весьма не-

простой, и, чтобы окончательно разрешить ее, необходимо проведение дальнейших исследований. Тем не менее полученные данные позволяют с большой степенью вероятности говорить, во-первых, об условной согласованности кариологической, изозимной и молекулярной эволюции, а также о сложной зависимости соотношения степени дивергенции видов на разных уровнях организации от эволюционного возраста, во-вторых, о разных скоростях эволюции видов на разных уровнях их организации и в разных филетических линиях и, в-третьих, о возможности разной направленности эволюционного процесса в отдельных филетических линиях лесных мышей. Кроме того, совпадение усредненных кривых по данным сравнения уровней генетической дивергенции видов и пар видов в совокупности с постоянной средней величиной межвидовой дивергенции (см. предыдущие разделы) может свидетельствовать о генетическом гомеостазе в изучаемой группе видов, а также канализации в ней видообразовательных процессов.

1.7. Молекулярная филогения лесных и полевых мышей по данным рестрикционного анализа суммарной яДНК

Вероятностное описание обладающих объективной стохастичностью процессов ...принято потому, что других способов описания подобных процессов просто нет... их вероятностная трактовка полностью адекватна их вероятностной природе.

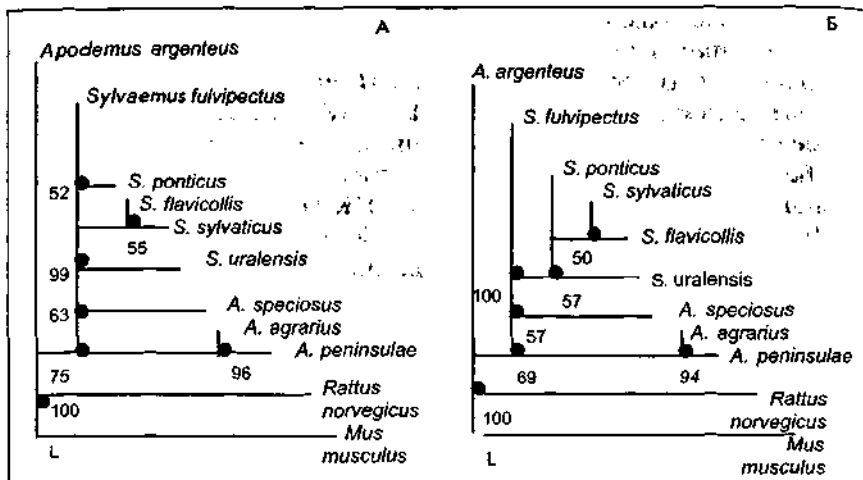
Е.А. Седов

Попытка генетического исследования лесных и полевых мышей методом анализа ПДРФ суммарной яДНК оказалась вполне оправданной для фено-и филогенетических реконструкций, эволюционных и таксономических исследований. Использование в филогенетических и таксономических исследованиях суммарной яДНК имеет преимущество в том, что позволяет получать прямую, а не опосредованную через надмолекулярные структуры, белки или ферменты информацию и, кроме того, дает возможность анализировать значительно большую, и — что особенно

важно — более разнообразную в функциональном плане часть генома, чем при использовании в качестве молекулярного маркера индивидуальных последовательностей/генов ядерной или цитоплазматической/митохондриальной ДНК. Кроме того, метод применим для сравнения высокодивергировавших видов и таксонов более высокого ранга, так как относительно низкие скорости эволюции яДНК по сравнению с мтДНК (Brown et al., 1979; Irwin et al., 1991) приводят к минимальной потере генетической информации при сравнении далеких разобщенных форм. Весьма привлекательна и простота исполнения экспериментов по рестрикционному анализу суммарной яДНК эукариот, хотя правильное прочтение картин рестрикции и их адекватная интерпретация могут быть осложнены наличием высокого фонового уровня (за счет присутствия уникальных и полиморфизма повторяющихся последовательностей). Модификация оригинальной методики посредством радиоактивного мечения рестрикционных фрагментов ДНК с последующим их разделением в полиакриламидных гелях (Федоров и др., 1992) упростила процедуру анализа данных, обеспечив определенный успех исследований данного направления (Банникова и др., 1995, 1996; Медников и др., 1995), хотя и сузила доступный для анализа электрофоретический спектр фрагментов ДНК. В заключении этого раздела исследований мы объединили все полученные ранее результаты, расширили число видов до максимально возможного и увеличили набор рестриктаз до 12.

На рис. 13 представлены результаты кладистического анализа 9 видов по 168 суммарным и ПО информативным признакам (т. е. рестрикционным фрагментам яДНК). В качестве внешней группы были использованы виды, представляющие два других рода мышевидных грызунов семейства Muridae: серая крыса *Rattus norvegicus* и домовая мышь *Mus musculus*, — не являющихся, согласно существующим требованиям, прямой производной ни одного из членов исследуемой группы (Павлинов, 1990). Некоторые авторы вообще не исключают возможности одновременного Происхождения всех вышеперечисленных родов мышевидных грызунов от общего филогенетического предка/предков (Bonhomme et al., 1985), что полностью отрицает существование связи типа предок—потомок между анализируемыми видами и внешней группой.

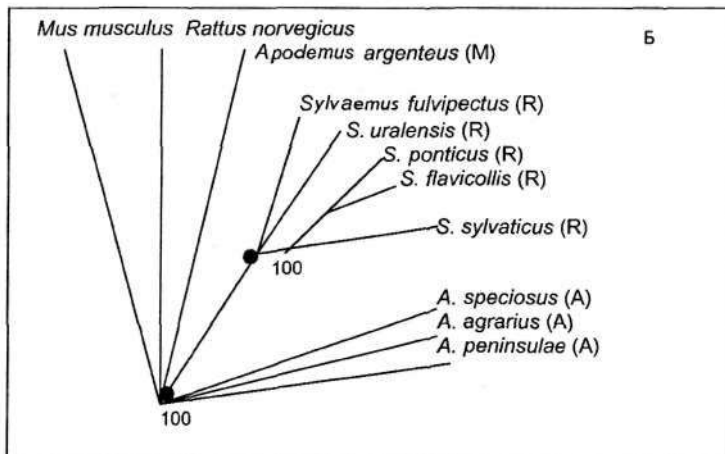
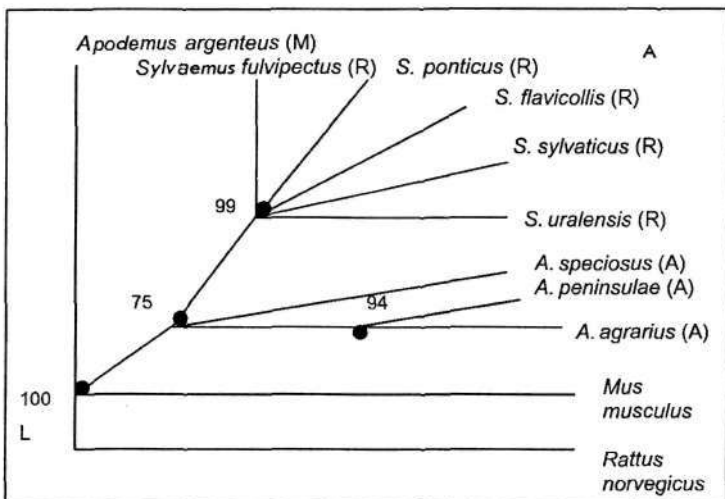
Анализ данных методом максимального правдоподобия, использующего алгоритм программы PENNY, установил два дерева

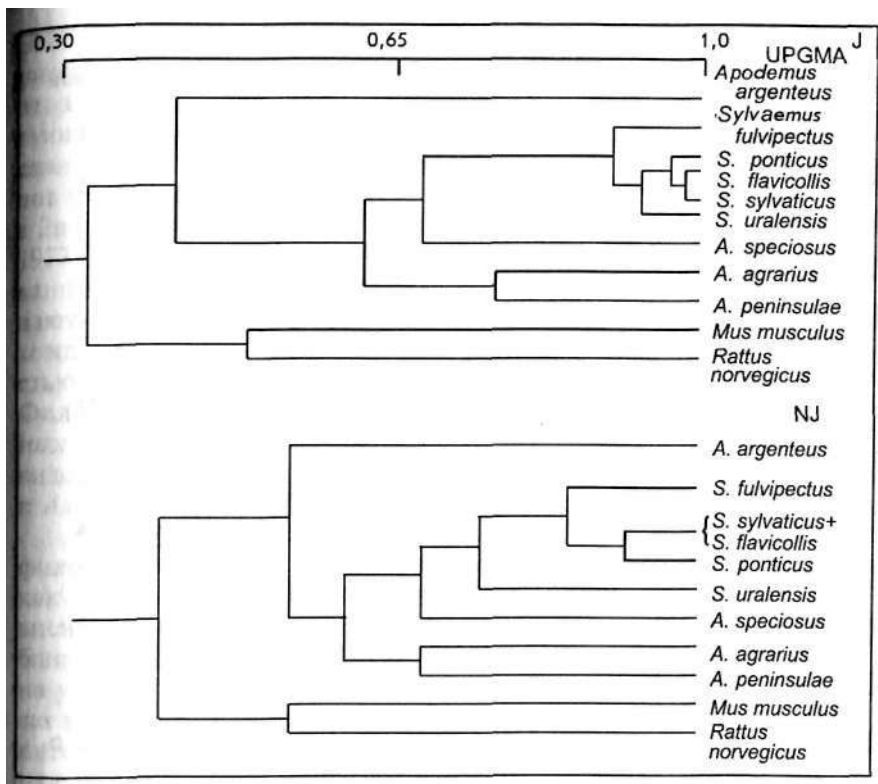


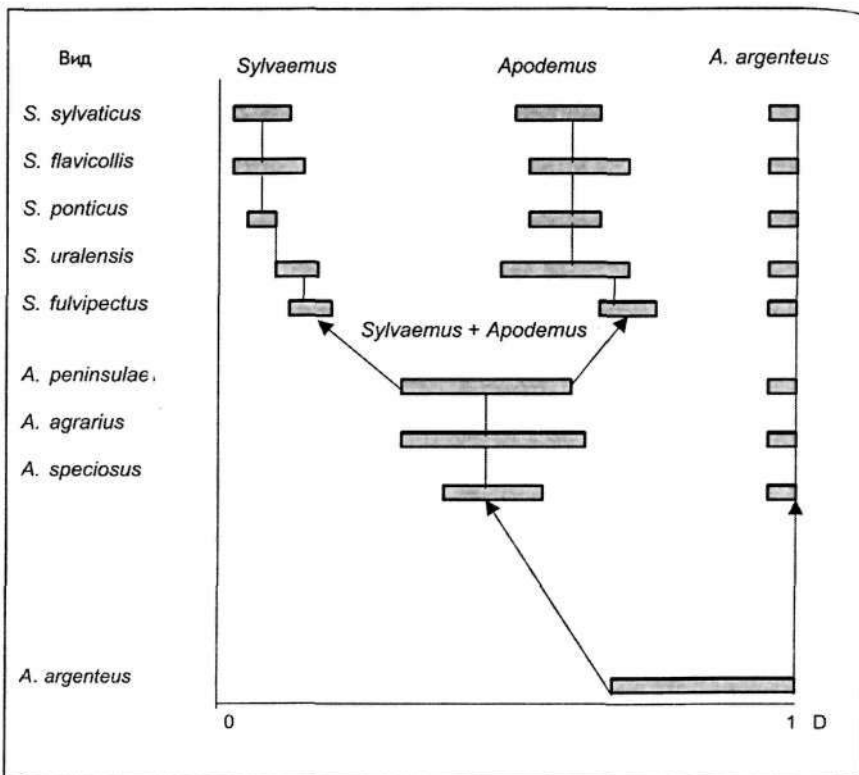
щи видами (*A. argenteus*, *A. peninsulae*—*A. agrarius*, а также *A. speciosus*), варьирует на кладограммах от 57 до 75 % или от 57 до 69 % • Стабильность взаиморасположения европейских и кавказских видов немного ниже: значения доверительного уровня в различных точках ветвления колеблются от 43 до 53 % и от 59 до 69 % • Вместе с тем кладограммы практически со 100 %-ной вероятностью подтверждают монофилетическое происхождение для этой группы мышей.

Таким образом, с высокой степенью достоверности, 70—100%, полученные деревья разделяют все виды на: 1 — южнопалеарктическую (*A. argenteus*), 2 — восточную (*A. agrarius*, *A. peninsulae*, *A. speciosus*) и 3 — западную (*S. sylvaticus*, *S. flavicollis*, *S. uralensis*, *S. ponticus*, *S. fulvipectus*) группы Северной Палеарктики. Если снизить доверительный интервал до 57 %, то на полученной филограмме можно выделить четвертую филетическую линию, представленную *A. speciosus* (рис. 14). Эти же четыре группы видов выделяет UPGMA-дендрограмма генетического подобия (рис. 15). Тем не менее, если на линейной шкале отложить парные генетические дистанции каждого вида со всеми остальными, то оказывается, что множество вариантов сравнения укладывается всего в три типа (рис. 16), характерных соответственно для западной группы видов, восточных лесных мышей с *A. agrarius* Северной Палеарктики и для южнопалеарктической *A. argenteus*. В целом это распределение поразительно напоминает классическую схему дихотомии при дивергентной эволюции.

Оценки масштаба межвидовой дивергенции колеблются в широком диапазоне: от 0,24—2,19 % между представителями западноевропейской фауны и кавказского региона до 4,88—8,99 % у восточноазиатских мышей Северной Палеарктики и 9,93—12,53 % для южнопалеарктической лесной мыши с остальными представителями «*Apodemus*». Таким образом, разница генетических дистанций между наиболее близкими и наиболее далекими видами лесных мышей достигает более чем 50-кратной величины. Различия *Mus* с *Rattus* несколько ниже (9,73 %), чем *Apodemus* и *Sylvaemus* как с *Mus*, так и с *Rattus*, составляющие в среднем 12,48 % и 10,01 % соответственно. В этих же пределах находятся значения Уровней дивергенции *A. argenteus* с остальными представителями лесных и полевых мышей. Время дивергенции «*Apodemus*» от общей филетической линии грызунов из расчета, что скорость эво-





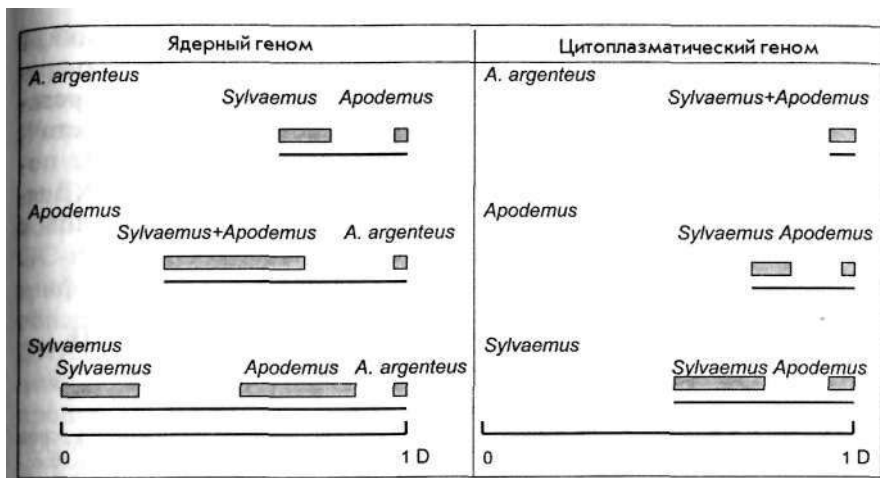


растеризуются 375 пн сатДНК («*Rattus*»-*mn* сегментации). По кариологическому сходству (тонкой структуре хромосом) северопаlearктические виды подразделяются на две группы, соответствующие выделенным нами, а наиболее обособлена южноазиатская *A. argenteus*, в кариотипе которой не 48, как у остальных видов (примечание: красная японская мышь имеет две кариоморфы: с $2n=46$ и $2n=48$), а 46 хромосом (Бекасова, 1980; Воронцов и др., 1977; Yoshida et al., 1975). Примечательно, что данные секвенирования участка гена цитохрома *b* мтДНК (см. гл. 2 наст. работы) дают большие вероятностные оценки монофилетического происхождения каждого из выделяемых филумов, подтверждая полностью один из вариантов кластеризации еврокавказских видов, филогенетические реконструкции лесных мышей по базам данных изозимной изменчивости также поддерживают такое деление видов на группы, высоко дифференцируя *A. peninsulae*, *A. speciosus* и *A. argenteus* (Межжерин, Зыков, 1991; Павленко, 1990).

Взаиморасположение эволюционно более старых видов на филогенетических деревьях относительно стабильно, в то время как в эволюционно молодой группе оно может изменяться в зависимости от применяемого метода обработки данных. Наиболее близкими в филогенетическом аспекте, не всегда подтверждаемом на уровне фенотипического сходства, определяются либо *S. ponticus* и *S. flavicollis*, либо *S. ponticus* и *S. fulvipectus*. Простым дефицитом взвешиваемых признаков такие колебания объяснить, с нашей точки зрения, невозможно, так как аналогичный характер неустойчивости подтверждается по крайней мере и на изозимном Уровне (Межжерин, Зыков, 1991; Павленко, 1990; Межжерин и др., 1992; Pavlenko, 1995). Скорее всего, этот результат отражает особенности фомообразования и молекулярной эволюции лесных и полевых мышей. Действительно, как было обнаружено нами Позже, *S. ponticus* и *S. flavicollis* имеют тесные связи, предполагающие в их общей эволюционной истории возможность события межвидовой гибридизации (см. гл. 2 в наст. работе). Наиболее существенное отличие наших данных от зоологической классификации заключается в целесообразности выделения *A. argenteus* в самостоятельный таксон не ниже подродового ранга, так как данный вид формирует отдельную филетическую ветвь, имеющую высокие вероятностные оценки ее монофилетичности и характеризуется самыми высокими (на уровне межродовых) генетиче-

скими дистанциями между ним и остальными предшественниками *Apodemus* и *Sylvaemus*. Четкая дифференциация *A. peninsulae* с *A. agrarius* в сочетании с высокой вероятностью монофилетичности их происхождения коррелирует с неоднозначностью положения указанных видов во внутриродовых зоологических системах классификации, относящих виды либо к одному (*Alsomys*) (Громов, Баранов, 1981), либо к двум (*Alsomys* и *Apodemus*) (Павлинов и др., 1995; Musser, Carleton, 1993) разным под родам. Эта ситуация удивительно напоминает (но не повторяет!) описанную для *S. ponticus* с *S. flavicollis*. По ядерному геному *A. peninsulae* и *A. agrarius* на фоне высоких генетических дистанций между ними достоверно объединены в общий филум, но по митохондриальному они принадлежат к двум высокодивергировавшим филогенетическим ветвям (Челомина и др., 1998; Chelomina et al., 1999; Serizawa et al., 2000). Кластеризация еврокавказских видов в единую монофилетическую группу полностью соответствует зоологической классификации, никогда не имевшей на этот счет серьезных разногласий (Громов, Баранов, 1981; Павлинов и др., 1995; Musser, Carleton, 1993). Примечательность положения *A. speciosus* на филогенетической схеме заключается в его наибольшей близости к эволюционно молодой группе еврокавказских видов, что другими генетическими исследованиями не отмечалось. Напротив, данные анализа ПДРФ рДНК ядер определяли *A. speciosus* как один из эволюционно более старых и наиболее дивергировавших среди лесных и полевых мышей вид (Suzuki et al., 1990).

Хотя значения эволюционного возраста лесных и полевых мышей из-за ввода в анализируемую группу *A. argenteus* увеличилось с 8–10 до 12 млн лет, эти данные не контрастировали с уже имеющимися сведениями. Однако по сравнению с оценкой (6 млн лет), выводимой (с учетом всех типов замен) по данным секвенирования участка гена цитохрома *b* мтДНК *Apodemus* (см. гл. 2 в наст. работе), эти различия существенны. Шкала межвидовых генетических дистанций для разных методов (в данном случае и уровней организации) тоже в значительной мере различается. В итоге различия в оценке генетических дистанций между эволюционно молодыми и эволюционно старыми видами лесных и полевых мышей на уровне мтДНК всего лишь 2-кратны, в то время как по результатам ПДРФ суммарной яДНК они достигают 50-кратной величины (рис. 17).



группировок и количество видов фауны Северной Палеарктики, в результате чего все они объединены в секцию «*Apodemus*» (парафилетическую по мнению авторов), представленную двумя родами: *Apodemus* и *Sylvaemus*, включающими соответственно восточно-и западнопалеарктические виды. Следующим шагом, мы полагаем, должно быть подразделение азиатских видов лесных мышей по крайней мере на северо-и южнопалеарктическую группы с приданием им соответствующего таксономического статуса.

1.8. Гипотетическая схема организации и эволюции сатДНК мышевидных грызунов

Первоначала вещей, многократно свои положения в мире меняя, в расположении они, наконец, попадают, из коих вся совокупность вещей получилась в теперешнем виде.

Тит Лукреций Кар

Сателлитная ДНК в геномах эукариот была открыта еще на заре молекулярной генетики, в начале 70-х годов прошлого столетия. Классификация сателлитов основана на их размере, варьирующем от нескольких нуклеотидных пар до нескольких тысяч. Со времени своего открытия (Kit, 1961), когда при центрифугировании в градиенте плотности CsCl суммарной клеточной ДНК мыши кроме основного пика был обнаружен добавочный (сателлитный) компонент, сатДНК занимает приоритетные позиции в молекулярно-генетических работах. Вначале в центре внимания были вопросы физико-химических свойств и функциональных особенностей сателлитной фракции эукариотического генома. Оказалось, что этот класс повторов объединяет большую разнообразную группу последовательностей, тандемно организованных в непрерывные кластеры (в которых мономеры расположены по типу «голова к хвосту»). По внутренней структуре и размеру сатДНК можно разделить на простую (классическую) и сложную. Простые сатДНК состоят из коротких, 2–20 пн, тандемно повторяющихся последовательностей, образующих длинные блоки. Количество простой сатДНК у разных организмов варьирует от 1 до

го %, а число сателлитов у одного вида может достигать 10–12, причем в одном и том же организме сатДНК по нуклеотидному составу могут быть либо очень похожими, либо очень разными (Газарян, Тарантул, 1983).

Одной из характерных особенностей строения большинства сатДНК (прежде всего простой) является отличие ее нуклеотидного состава от основной фракции, т. е. преобладание АТ-или GC-пар. Именно поэтому ее оказалось возможным выделить центрифугированием с солями тяжелых металлов. Сателлитная ДНК обнаруживается и при исследовании кинетики реассоциации ДНК. Данный метод, основанный на том, что скорость образования связей между одноцепочечными молекулами ДНК прямо пропорциональна концентрации комплементарных нуклеотидных последовательностей, впервые был применен Р. Бриттенем и Д. Коне (Britten, Kohne, 1968).

С открытием ферментов рестрикции изучение сатДНК значительно продвинулось. Использование рестриктирующих эндонуклеаз позволило также выявить и охарактеризовать более сложные сателлиты, организованные тандемно, как и простые, но не имеющие с ними гомологии и не обнаруживаемые с помощью ультрацентрифугирования в градиентах солей тяжелых металлов — так называемые криптические (т. е. скрытые) сателлиты. Поскольку в результате мутаций, имеющих место в эволюции, сайты рестрикции в сатДНК изменяются, при рестрикционном анализе можно наблюдать образование мультимерных фрагментов («лестница» полос, содержащих кратные по длине последовательности ДНК) (Газарян, Тарантул, 1983). Однако периодичность организации не является обязательным свойством всех сателлитов. Для сложных сатДНК приматов и грызунов показано сегментарное строение, на основании чего было сделано предположение о двухэтапном процессе эволюции этих последовательностей: дупликация-дивергенция-амплификация. Они могут содержать последовательности с прямыми и обращенными повторами на конце, которые, видимо, внедрились в сатДНК подобно транспозонам бактерий. В отличие от простых, между сложными сатДНК существует гомология, что предполагает наличие для них общей предковой последовательности (Потапов и др., 1990; Иванов и Др. 1991).

С помощью метода молекулярной гибридизации *in situ* было показано, что сатДНК большинства видов локализуется преимущественно в конститутивном хроматине вблизи центромер и теломер (Arrighi et al., 1974). Помимо внутренней иерархической структуры и преимущественной локализации в гетерохроматиновых областях, тандемные повторы являются эволюционно более лабильными и могут обладать видоспецифичностью (Arnason, Widegren, 1986; Потапов и др., 1990). Существуют, однако, примеры значительной эволюционной консервативности сатДНК. Одним из них, пожалуй наиболее ярким, является сатДНК кошачьих, которая найдена у самых разных видов плацентарных млекопитающих, где она рассеяна по геному (Fenning, 1987). Предполагают, что некоторые сателлиты современных тритонов имеют возраст около 20 млн лет со времени отделения рода от общего филогенетического ствола (Vignall et al., 1991).

Результаты сравнительного анализа высоких повторов позволили Х. Макгрегору и С. Сессиону классифицировать сателлиты тритонов (*Amphibia*) по филогенетическому возрасту (MacGregor, Sessions, 1986), относя к самым «молодым» сателлиты центромерного, а наиболее «старым» — прицентромерного и теломерного участков гетерохроматина. Взаимосвязь между типом хромосомной локализации и эволюционным возрастом повторов выявлена и у куницеобразных (Лушникова, 1989). У них наиболее старые сателлиты диспергированы по хромосомам. Очевидно, это общее свойство сатДНК всех позвоночных.

Функции сатДНК связывают в основном с конститутивной ролью этих последовательностей в поддержании структурной целостности хромосом, стабилизации центромер, создании различий в центромерных районах хромосом, в узнавании гомологичных хромосом при мейозах, а также в контроле за размерами ядра и клеточным ростом. Р. Бриттен и Д. Конне предположили, что сатДНК, подвергаясь в процессе эволюции мутациям и рекомбинациям с другими последовательностями ДНК, увеличивает возможность организма получать новую генетическую информацию (Britten, Kohne, 1968). Согласно другой гипотезе гетерохроматин (сатДНК) образует своего рода экран для защиты жизненно важных участков ДНК от мутаций и кроссинговера, так как хромосомные разрывы локализуются преимущественно в гетерохроматине (Walker, 1987; Hsu, 1975). Гипотеза «эгоистической» ДНК,

двинутая В. Дулиттлом и С. Сапиенза (Doolittle, Sapienza, »80), а также Л. Оргелом и Ф. Криком (Orgel, Crick, 1980), заключается в том, что за сатДНК не признается каких-либо особых функций. Подобно организмам-паразитам, встраиваясь в геном, она размножается, долгое время не принося ни вреда, ни пользы. Однако накопленный за последние годы материал позволяет весьма критически относиться к гипотезе селективной нейтральности сатДНК (Varley et al., 1990).

Общие представления о возникновении и эволюции tandemно повторяющихся последовательностей были сформулированы еще в 1968 г. Р. Бриттенем и Д. Конне (Britten, Kohne, 1968), предположившими, что повторы ДНК возникают в результате «скачкообразной» репликации, т. е. на определенных этапах развития происходит значительное умножение уникальных последовательностей с образованием tandemных блоков. Причем это умножение (т. е. амплификация) может происходить в несколько стадий, достаточно далеко отстоящих во времени. В процессе эволюции они претерпевают изменения и рассеиваются по геному, обеспечивая возможность формирования новой генетической информации и в случае повторной взрывной репликации — новых видов сатДНК. При этом любое фиксируемое изменение первичной структуры в базовой последовательности очень быстро распространяется по всей сатДНК вида. Основываясь на этих взглядах, Ф. Хэтч с сотрудниками (Hatch et al., 1976), а также В. Солвер с коллегами (Salser et al., 1976) выдвинули гипотезу о «библиотеке» повторяющихся последовательностей. Согласно данной гипотезе, филогенетически близкие организмы содержат наборы сходных предковых последовательностей в малых количествах копии, т. е. «библиотеку» последовательностей. В определенные моменты эволюции происходит быстрая амплификация некоторых копий до количеств, характерных для сатДНК. В то же время содержание других последовательностей сатДНК может уменьшаться до нескольких или одной-единственной копии. Разнообразии в последовательности «библиотек» вносят мутационные процессы.

Сателлитную ДНК уже давно используют в качестве молекулярного маркера в эволюционных и филогенетических исследованиях. Однако мнения о значении сатДНК в эволюции и видообразовательных процессах разное. Одни (Джиллеспи и др., 1986)

считают, что качественная оценка эволюции возможна лишь на основе изучения сатДНК. И как наиболее информативный подход рассматривают классификацию животных исключительно по типам сатДНК, приписывая важную роль сатДНК в формообразовании. Другие полагают, что видообразование не обязательно связано с изменением количества сатДНК или первичной структуры ее «базовой» последовательности. В. Бирштейн (1987), например, отмечает, что в одних случаях при видообразовании содержание этой фракции (сатДНК) довольно резко изменяется, в других — появляются новые фракции и видообразование может не сопровождаться видимыми изменениями этой фракции.

В настоящее время мини-и микро-сатДНК (локусы переменного числа tandemных повторов) достаточно успешно применяются в качестве молекулярных маркеров для микропопуляционного и семейного анализов и т. п. Основной интерес к сатДНК у эволюционистов связан с существованием коррелятивных связей между появлением новых типов сатДНК и видообразованием, а также с ее адаптивной ролью. Нами изучение сатДНК лесных и полевых мышей «*Apodemus*» было начато с помощью рестрикционного анализа ДНК (см. предыдущие разделы). Число изучаемых видов было увеличено с 5 ранее изучавшихся до 11, включая (в качестве внешней группы) домовую мышь *Mus musculus* и серую крысу *Rattus norvegicus*, также принадлежащих семейству мышевидных грызунов Muridae. Ставились следующие конкретные задачи:

- выявить сатДНК в геноме каждого исследуемого вида;
- определить некоторые физико-химические свойства сатДНК лесных и полевых мышей (количество, иерархичность, внешнюю и внутреннюю сегментацию, ПДРФ);
- проанализировать характер эволюции сатДНК в пределах группы «*Apodemus*» (обращая особое внимание на возможность существования различных коррелятивных связей);
- сконструировать гипотетическую схему организации и эволюции сатДНК анализируемых видов грызунов.

Из предыдущих работ было известно, что сатДНК лесных мышей гидролизуются рестриктазой HindIII-по типу сатДНК *Rattus norvegicus*, т. е. на фрагменты, кратные 375 пн (Cooke, 1975). На основании данных плавления и ПДРФ сатДНК двух близких видов европейских лесных мышей (*Sylvaemus sylvaticus* и *S. flavi-*

colls) был сделан вывод о консервативном характере молекулярной эволюции сатДНК «*Apodemus*» (Cooke, 1975; Brown, Dover, 1979). Возможно, именно такой вывод погасил появившийся интерес молекулярных генетиков к данной группе на многие годы. Вторичный интерес к ним возник много лет спустя (Hirning et al., 1989), хотя объективные показатели для изучения сатДНК лесных и полевых мышей были известны раньше. Прежде всего это 1) значительное количество С-окрашиваемого гетерохроматина в кариотипах почти всех видов, предполагающее высокое содержание сатДНК (Gamperl et al., 1982) и, соответственно, легкость ее обнаружения и выделения молекулярными методами; 2) относительно высокая изученность лесных и полевых мышей на других уровнях их организации: морфологическом, кариологическом и изозимном (Воронцов и др., 1992; Межжерин и др., 1992; Лавренченко, Лихнова, 1995); 3) наконец, существование проблемы классификации «*Apodemus*», т. е. необходимость таксономической ревизии лесных и полевых мышей с применением прежде всего различных генетических подходов.

Как показали наши исследования, сатДНК большинства европейских видов лесных мышей, а также восточноазиатской лесной мыши действительно выявляется рестриктазой HindIII-в виде дискретных фрагментов размером $px375$ пн. Однако гидролизаты сатДНК при всем их сходстве имеют вполне определенные межвидовые различия по содержанию ДНК в отдельных фрагментах, длине мультимера, наличию и локализации внутреннего HindI сайта. Более того, согласно нашим и литературным данным (Cooke, 1975) геномы *A. speciosus*, *A. argenteus*, *A. agrarius* и *A. mystacinus* не содержат такого типа сатДНК. Не обнаруживалась она и в HindIII-гидролизатах *Mus musculus* (наши данные). Поэтому виды «*Apodemus*» мы условно разделили на «*Rattus*»- (содержащие HindIII-сатДНК) и «Л/мда-подобные» (не содержащие HindIII-сатДНК). Позже, с учетом новых данных, мы откорректировали подразделение видов лесных и полевых мышей на группы согласно особенностям молекулярной организации их сатДНК.

В геноме *A. peninsulae* кроме HindIII-сателлита нами был обнаружен короткий (30 пн) видоспецифичный BspRI-сателлит. Это самый низкомолекулярный мономер сатДНК лесных и полевых мышей. Аналогичный результат был зарегистрирован нами лишь малоазийской песчанки (Челомина и др., 1990). Но там появ-

ление низкомолекулярного сателлита мы связывали с хромосомным видообразованием и ярко выраженным внутривидовым кариотипическим полиморфизмом. Высокая представленность сателлитного BspRI-компонента может быть свидетельством того, что он является основным в сателлитной фракции генома дальневосточной лесной мыши. Его сходство с низко молекулярным сателлитом песчанок (неожиданно) привело нас к мысли о его возможной причастности к образованию добавочных В хромосом. Мы полагаем, на современном этапе молекулярных технологий проверка данной гипотезы вполне реальна.

В геноме *A. argenteus* HindIII-сатДНК представлена очень слабо и лишь в виде тримера, что первоначально и дало нам основание отнести данный вид к группе «*Mus*». Справедливость такого предположения была подтверждена позже, после более детального рестрикционного анализа ДНК *A. argenteus*. Выяснилось (см. выше), что у японской лесной мыши мажорная сатДНК расщепляется с образованием хорошо выраженной «лестницы» EcoRI-фрагментов, имеющих точно такую же длину мономера, как у домового мыши *M. musculus*, т. е. 240 пн. Данный результат был не только неожиданным, он резко контрастировал с выводами авторов предыдущих работ о консервативном характере эволюции сатДНК лесных и полевых мышей (Cooke, 1975; Brown, Dover, 1979) и еще раз указывал на глубокую генетическую дивергенцию видов «*Apodemus*», а также на необходимость их таксономической ревизии.

Что касается *A. speciosus*, кариотип данного вида характеризуется самым низким среди исследованных видов *Apodemus* и *Sylviaemus* содержанием гетерохроматина. Это предполагает небольшое количество сатДНК в его геноме. Действительно, рестрикционные фрагменты ДНК *A. speciosus* почти во всех гидролизатах имеют крайне слабое свечение в УФ. Возможно, сатДНК данного вида наиболее полно выщепляется рестриктазой Cfr13, продуцирующей достаточно яркую 130 пн полосу и ее димер. В таком случае внешняя сегментация сатДНК красной японской мыши такая же, как у минорной сатДНК *Mus*. Кроме того, в ее геноме возможно наличие сатДНК с другим типом сегментации, так как в этих же гидролизатах (но в меньших количествах) регистрируется серия фрагментов с размером, кратным 90 пн, т. е. как в EcoRI-гидролизатах сатДНК крыс рода *Rattus* (Witney, Furano,

1983). К сожалению, эти данные пока носят предварительный характер. Однако совершенно очевидно, что их подтверждение будет иметь несомненный интерес.

В геноме *A. agrarius* и *S. fulvipectus* (подобно *M. musculus*) обнаружен низкокопийный HindIII-компонент с молекулярной массой примерно 330—340 пн. Примечательно, что в геноме *S. fulvipectus* он содержится вместе с мажорным 375 пн компонентом, и это является единственным примером содержания в одном геноме одновременно двух фракций, характеризующих, с одной стороны, лесных, а другой — полевых мышей. Интересно, что именно *S. fulvipectus* имеет черты, характерные для азиатских лесных мышей подрода *Alsomys* как на организменном (о чем свидетельствует коллекционный зоологический материал), так и молекулярном (резистентность сатДНК к рестриктазе, расщепляющей сатДНК остальных европейских видов, а также наличие 2,5 тпн EcoRI-повтора, идентифицируемого еще лишь у азиатской *A. speciosus* о-ва Кунашир) уровнях. Эти безусловно гетерогенные по типам внешней сегментации виды (*A. peninsulae*, *A. agrarius* и *A. speciosus*) мы условно объединили в одну группу — «*Apodemus*», так как все они содержат БайЗа-повторы с размерами, кратными 30 пн.

Результаты гидролиза ДНК рестриктазами BspRI, TagI, BglII и Sau3a (см. выше) подчеркивают высокую дифференциацию сатДНК у видов «*Mus*», «*Rattus*» и «*Apodemus*»-группы. Они также демонстрируют строгую корреляцию типов сатДНК с географическим распространением видов. Кроме того, Sau3a — единственная рестриктаза, гидролизующая у всех видов «*Apodemus*» преимущественно tandemно организованные повторы, т. е. по всей видимости, предковая последовательность сатДНК этих грызунов содержала в себе регулярные БайЗа-сайты. У *A. argenteus*, как мы уже отмечали, Sau3a выщепляет основной повтор сатДНК, у *A. agrarius* с *A. peninsulae* и, вероятно, у *A. speciosus* — tandemный повтор с размером фрагментов, кратным примерно 30 пн. В геномах западнопалеарктических лесных мышей этот фермент выщепляет серию хорошо дифференцированных и отличающихся по яркости фрагментов ДНК, которые можно разделить на два мультимерных ряда (субповтора) с молекулярной массой, кратной примерно 120—130 и 170—180 пн. Примечательно, что такие же размеры имеют соответственно минорная фракция сатДНК домовых мы-

шей (Pietras et al., 1983; Бирштейн, 1987) и субповтор сатДНК шей и черной крыс (Gupta, 1983; Witney, Furano, 1983). В геноме *S. fulvipectus* основным является первый из 8ai3a-субповторов, а в геномах *S. sylvaticus*, *S. flavicollis*, *S. ponticus* и *S. uralensis* — второй.

Таким образом, имеющиеся данные предполагают что тщательный анализ рестрикционных фрагментов может иметь первостепенную важность в выяснении молекулярных механизмов видообразования и эволюции генома лесных мышей, а также в выяснении молекулярной структуры, путей формирования и эволюции их сатДНК. Следовательно, может быть вполне вероятным, например, что в геномах лесных мышей содержатся два типа сателлитных последовательностей, каждый из которых имеет тот или иной характер сегментации рестриктазой Sau3a. Межвидовые отличия в количестве Bai3a-субповтора тогда обязаны избирательной амплификации последовательностей сатДНК при видообразовании и дивергенции видов. Именно такое объяснение, т. е. возможность сосуществования различных независимо эволюционирующих субповторов, известно, например, для семейства AluI-повторов генома человека (Batzer et al., 1991). Возможна, однако, и альтернативная точка зрения. Она заключается в том, что оба субповтора представляют одну и ту же последовательность сатДНК. Слабые полосы могут быть результатом потери рестрикционных сайтов между двумя соседними последовательностями (в том числе субповторами) — родственными, но не идентичными, представляющими яркие полосы. Из этого следует, что в анализируемом здесь примере кратность размера фрагментов в мультимерных рядах носит скорее случайный, а не обязательный характер. Рассуждения в пользу второй точки зрения ассоциируются с нашим предположением о том, что HindIII-повтор лесных мышей состоит из двух субповторов, размером примерно 240 и 130 пн, предшественниками которых могут быть соответственно последовательности мажорной и минорной сатДНК домашних мышей рода *Mus*. Обнаружение в геноме *A. argenteus* сатДНК с *Mus-munoi* внешней сегментации в какой-то мере подтвердило это предположение.

Совокупность собственных экспериментальных данных (табл. 5), а также результаты исследований других авторов как внутренней структуры повтора сатДНК мышей рода *Mus*, т. е. выведение его формулы: $(3 \times 58) + 60 / (28 + 30) \times 4$ пн, так и сатДНК

Типы внешней сегментации сатДНК видов *Apodemus* и *Sylvaemus*
Types of external segmentation of *Apodemus* and *Sylvaemus* satDNA

| Размер повтора сатДНК, пн | Специфические ферменты | Тип фрагментов |
|---------------------------|------------------------|-----------------|
| 370 | HindIII | <i>Rattus</i> |
| 180 | Sau3a | <i>Rattus'</i> |
| 90 | CfrI3 | <i>Rattus'</i> |
| 330 | HindIII | <i>Mus'</i> |
| 240 | EcoRI | <i>Mus</i> |
| 240 | Sau3a | <i>Mus</i> |
| 240 | Csp61 | <i>Mus</i> |
| 130 | Sau3a | <i>Mus''</i> |
| 130 | CfrI3 | <i>Mus''</i> |
| 30 | Sau3a | <i>Apodemus</i> |
| 30 | BspRI | <i>Apodemus</i> |

Rattus, т. е. выявление кратности размера субъединиц основного повтора 30 пн, дают основание предположить достаточно простую схему организации и эволюции сатДНК в геномах лесных мышей же. 18). Она легко объясняет

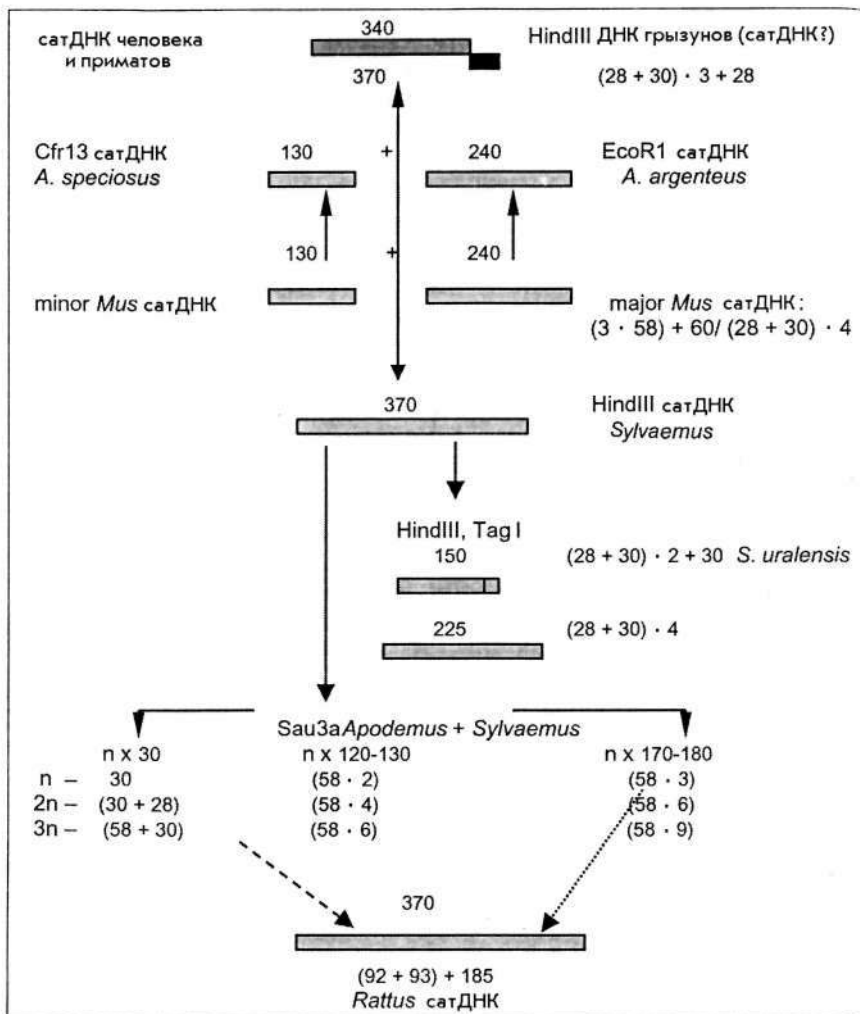
— наличие в Bai3a-гидролизатах ДНК исследуемых видов двух мультимерных рядов фрагментов;

— появление в геномах некоторых видов «*Apodemus*» минорных HindIII-компонентов с молекулярной массой примерно 330 пн;

— наличие в геномах *A. peninsulae*, *A. agrarius* и *A. speciosus* сатДНК с размером фрагментов, кратным примерно 30 пн;

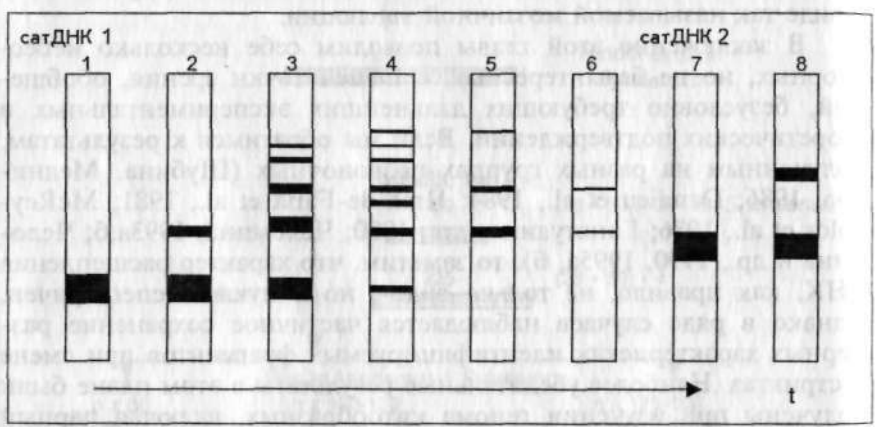
— существование в геномах лесных и полевых мышей сатДНК с «*Mus*»-, «*Rattus*»-«*Apodemus*» типами внешней сегментации.

Согласно предлагаемой схеме при всем отличии во внешней сегментации основной повтора сатДНК лесных, домашних мышей и крыс имеет один и тот же тип внутренней сегментации, т. е. состоит из двух базисных последовательностей длиной 28 и 30 пн. Множественность вариантов комбинаций одних и тех же базисных последовательностей обеспечивает высокое разнообразие типов сатДНК при их безусловном (большем или меньшем) фило-



внешней сегментации сатДНК. У разных видов, что совершенно очевидно, сходство сатДНК будет зависеть как от времени дивергенции этих видов, так и от их общего предка/предков. Общим же предком для всех представителей исследованной группы был вид, предшествующий=наиболее близкий современным мышам рода *Mus*, если, конечно, они возникли в результате классической дивергентной эволюции. Кроме того, полученные данные могут, с нашей точки зрения, рассматриваться в пользу гипотезы существования геномных «библиотек» последовательностей сатДНК млекопитающих. В широком смысле это свойство эукариотического генома может, как нам представляется, проявляться в виде так называемой мозаичной эволюции.

В заключение этой главы позволим себе несколько небесспорных, но не безынтересных, с нашей точки зрения, обобщений, безусловно требующих дальнейших экспериментальных и теоретических подтверждений. Если мы обратимся к результатам, полученным на разных группах позвоночных (Шубина, Медни-Ков, 1986; Dandieu et al., 1984; Ilma-de-Faria et al., 1981; McReynolds et al., 1986; Гинатулин и др., 1980; Челомина, 1993а,б; Челомина и др., 1990, 1995а, б), то заметим, что характер расщепления ДНК, как правило, не только видо-, но и нуклеазоспецифичен. Однако в ряде случаев наблюдается частичное сохранение размерных характеристик идентифицируемых фрагментов при смене рестриктаз. Наиболее убедительные результаты в этом плане были получены при изучении генома китообразных, включая парный гидролиз различными рестриктазами и блот-гибридизацию с соответствующими молекулярными зондами — пробам ДНК (Arnason et al., 1984). Авторы продемонстрировали консерватизм повторяющейся ДНК как по длине, так и по нуклеотидной последовательности и предположили, что причина идентичности фрагментов кроется в амплификации предковой последовательности без внесения крупных изменений. Эти результаты не согласуются с представлением о различии между последовательностями высокоповторяющейся ДНК внутри вида, что, в частности, подтверждают вышеописанные данные по ПДРФ яДНК лесных и Полевых мышей. С другой стороны, они нашли неожиданную Поддержку в данных по молекулярной организации геномов свободноживущих червей (McReynolds et al., 1986; Челомина, Пашкова, 1991). В последней из цитируемых работ нами был описан



вторяющихся последовательностей ДНК может быть прямо пропорциональной эволюционному возрасту вида. Тогда по характеру структурной организации генома (т. е. ПДРФ яДНК) молодые и старые виды должны различаться между собой меньше, чем с видами, находящимися на промежуточной стадии, но будут иметь противоположный вектор (в смысле гомогенизации) эволюции повторяющихся элементов ДНК (рис. 19). Таким образом, I «неперспективных» в смысле видообразования форм, по-видимому, также должен обнаруживаться более унифицированный характер набора (и организации?) повторяющихся последовательностей ДНК. Видообразование, сопровождаемое различными геномными реорганизациями, включая возникновение новых геномных элементов, повлечет за собой разнообразие картин рестрикции. Подобные рассуждения приводят нас к вопросу, не является ли высокая степень гомогенизации часто повторяющихся последовательностей ДНК отражением эволюционного тупика — бильности вида, а их большое содержание — значительным генетическим потенциалом, который может реализоваться (и реализуется) при резких изменениях условий существования? Если так, наибольшим адаптивным и эволюционным потенциалом в настоящее время обладают южнопалеарктическая *A. argenteus* и группа западнопалеарктических видов лесных мышей. Именно здесь следует прежде всего ожидать возникновения новых форм и широкой видовой радиации.

**МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭВОЛЮЦИЯ, ФИЛОГЕНИЯ
И СИСТЕМАТИКА ПО ДАННЫМ ВАРИАбельНОСТИ
КОДИРУЮЩИХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ДНК
ЯДЕРНОГО И ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО ГЕНОМОВ**

Это не безнадежное противоречие... В тех случаях, когда два противоречащих друг другу описания могут быть по отдельности пригодными, то: а) описания взаимно дополняют друг друга: каждое из них «верно», если интересоваться одним определенным свойством материи; б) описания взаимно исключают друг друга... Это и есть всеисильный принцип дополнительности Бора...

Э. Роджерс

Таксономическая классификация и систематика видов как качественной ступени эволюции являются фундаментальными проблемами современной биологии. Основу для современной биологической классификации и таксономии обеспечивают молекулярные данные в совокупности с морфологическими. Усовершенствования в молекулярной филогенетике значительно увеличили наше понимание иерархической связи между родственными видами. За последние 30 лет были разработаны мощные аналитические методы для реконструкции филогенетических связей (эволюционных деревьев) и дендрограмм генетического подобия сравниваемых таксонов (видов, популяций). Множество программ математического моделирования эволюции эукариот на разных таксономических уровнях представляют два подхода: фенетический и кладистический. Фенетический подход состоит в том, чтобы, рассчитывая меру общего сходства между сравниваемыми таксонами, правильно оценить ранг каждого из них. Согласно кладистическому подходу организмы получают ранг и классифицируются исключительно в зависимости от давности происхождения от общего предка. Первый может неверно отражать количественное

сходство, сравнивая гетерогенные комплексы признаков, и неравномерно отражать различия между видами и высшими таксонами. Его результат в значительной мере зависит от выбранного числового метода. Второй подход приводит к ошибочным результатам потому, что игнорирует различия в темпах эволюции и путает генеалогическое родство с генетическим (Павлинов, 1990).

На практике в молекулярной филогенетике наиболее часто пользуются кластерным анализом (Sneath, Sokal, 1973), применяют методы максимального правдоподобия, максимальной парсимонии и бутстрепинг (Felsenstein, 1993). Кластерный анализ — метод иерархического группирования таксонов или последовательностей ДНК по сходству или дистанциям. Включает UPGMA — невзвешенный парно-групповой метод средних арифметических и WPGMA — взвешенный парно-групповой метод Средних арифметических. Методы максимальной парсимонии (MP) — таксономические методы, которые фокусируются на характере наблюдаемых величин и минимизируют число изменений в признаках между видами во всех деревьях, допуская примерно одинаковую скорость изменений. Изменения в каждом узле дерева Произведены в соответствии с требованиями последних изменений, чтобы удовлетворять каждому из двух статусов признака непосредственных потомков. Методы правдоподобия — анализ данных последовательностей ДНК, который основывается на генетических моделях и обеспечивает основу для статистических выводов. Методы максимального правдоподобия (ML) реконструкции ев определяют форму дерева, а затем выбирают длину ветвей, обы они максимально соответствовали данным этого дерева, ричем могут анализироваться разные деревья и из них выбираться айболее оптимальное. Бутстрепинг — это статистический метод, нованный на многократном случайном группировании, отличающемся от первоначального, чтобы обеспечить получение новых оценок параметра, по которому могут быть рассчитаны пределы достоверности ветвления древ.

Полученная хронологическая топология может применяться интерпретации морфологической и функциональной адаптации в контексте филогенетической иерархии (O'Brien, 1994). По-мо разрешения проблемы эволюционной иерархии видов и ункциональной адаптации филогенетический анализ выявляет кие примечательные события в истории развития видов, как

гибридизация. Молекулярные топологии часто базируются на данных стохастических (селективно нейтральных) сегментов ДНК, вероятнее всего, не вовлеченных в адаптацию вида. Эта адаптивная нейтральность является причиной, по которой данные сегменты ДНК полезны для построения эволюционных деревьев: их мутации кумулятивны, монотонны и подобны часам. Наиболее часто в качестве молекулярных маркеров в филогенетических исследованиях животных используют гены мтДНК и члены мультигенного семейства повторяющейся ядерной рибосомной ДНК (рДНК). В последнее время стали использовать белок-кодирующие гены и интроны яДНК.

Секвенирование последовательностей ДНК (определение порядка нуклеотидов в молекуле ДНК) — исчерпывающий метод анализа ядерного и цитоплазматического геномов. В 80-х годах прошлого столетия были разработаны два основных метода определения последовательности нуклеотидов в клонированных фрагментах ДНК. Один из них предложили А. Максам и У. Гилберт, другой — Ф. Сенгер (рис. 20). Эти работы ознаменовали новую эру в истории молекулярной генетики. За разработку методов секвенирования, клонирования и встраивания генов инсулина человека в бактериальную клетку У. Гилберт и Ф. Сенгер в 1980 г. были удостоены Нобелевской премии. Согласно первому (химическому) методу в одонитиевой ДНК избирательно делаются разрывы, 5'-концы метятся радиоактивным фосфором, после чего проводятся электрофорез в полиакриламидных гелях и радиоактивная идентификация фрагментов. Второй (ферментативный) метод используется чаще. Для каждого эксперимента ставят четыре реакции (отличающиеся присутствием того или иного модифицированного основания) с одонитиевой ДНК и прикрепленным к ней праймером. Достраивание цепи ДНК происходит до момента встраивания модифицированного основания, поэтому среди продуктов реакции будет множество фрагментов различной длины. Фрагменты разделяют в полиакриламидных гелях, и последовательности легко определяются. Возможность секвенирования в серийных лабораторных анализах появилась с разработкой новых технологий, позволяющих анализировать любые пробы, т. е. амплифицированные клонированием или с помощью PCR фрагменты ДНК, молекулярной массой выше 1000 пн (размер гена эукариотического генома равен в среднем 1500 пн) на авто-

5'-GTTTTCCAGTCACGACAATCAGGCTTAAA-3'
 3'-CAAAAGGGTCAGTGTGTTAGTCCGAATTT-5'

Денатурация ДНК для получения однонитиевой матрицы (показана одна нить)

5'-GTTTTCCAGTCACGACAATCAGGCTTAAA-3'

Добавление праймера и отжиг

3'-CAAAAGGGTCAGTGTGCT
 5'-GTTTTCCAGTCACGACAATCAGGCTTAAA-3'

Разделение на четыре образца, каждый с dATP, dCTP, dGTP, dTTP (по крайней мере один dNTP радиоактивно меченный) и ДНК полимеразой

ddATP

ddCTP

ddGTP

ddTTP

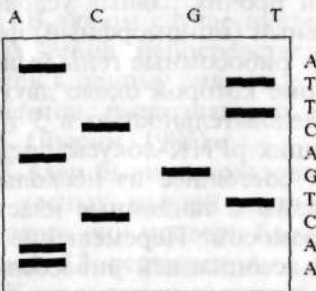
Праймер +A
 Праймер +AA
 Праймер +AATCA
 Праймер +AATCAGGCTTA
 Праймер +AATCAGGCTTAA
 Праймер +AATCAGGCTTAAA

Праймер+AATC
 Праймер+AATCФGGC

Праймер+AAECAG
 Праймер+AAECAGG

Праймер+AAT
 Праймер+AATCAG
 Праймер+AATCAGGC

Разделение фрагментов электрофорезом и визуализация радиоавтографией



A
 T
 T
 C
 C
 A
 G
 T
 C
 A
 A

матических лазерных секвенаторах. Пока ограничивающим фактором может быть недостаток специфических праймеров. Основные методы секвенирования ДНК подробно описаны (Palumbi, 1997), ими в настоящее время пользуются практически все молекулярно-генетические лаборатории.

2.1. Филогенетические реконструкции по данным дифференциации рестрикционных сайтов в генах рРНК

Набор генов, произошедших путем дупликаций и изменений от некоторого гена-предка, называется семейством генов. Члены одного семейства могут быть расположены рядом или разбросаны по геному, иметь сходные или идентичные функции. Высокая тандемная повторяемость генов означает, что продукты их экспрессии требуются в необычайно больших количествах. Примером тому могут служить гены рибосомной РНК (рРНК). В настоящее время не существует общепринятого объяснения многообразия структур генов эукариот. Некоторые гены не прерываются, и тогда их последовательности колинеарны последовательностям информационной РНК (мРНК). Но большинство генов характеризуются прерывистым строением, т. е. имеют вставочные последовательности, значительно различающиеся как по числу, так и по размерам. Существует мнение, что гены с большим числом интронов при прочих равных условиях должны продуцировать более стабильный (мономорфный) фенотип (Алтухов, 1993).

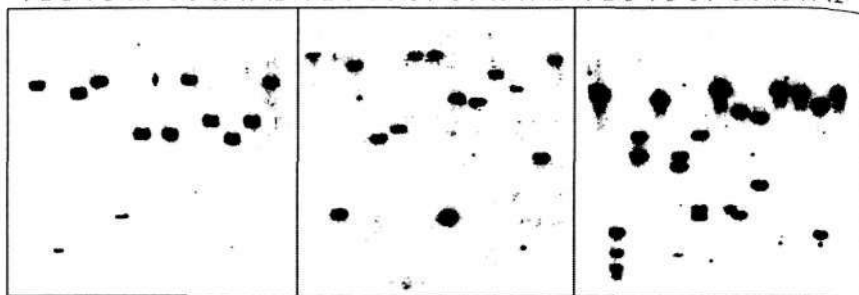
«Прерванные» рибосомные гены были впервые обнаружены у дрозофилы, в геноме которой около двух третей генов 28S рРНК прерываются последовательностью в 5 тпн (Льюин, 1987). В геноме млекопитающих рРНК-локусы представляют собой мультигенное семейство, состоящее из нескольких сот копий, которые обычно организованы в тандемные кластеры и распределены по разным сайтам хромосом. Перемещение этих локусов по геному можно объяснить ассоциацией рибосомных генов с лабильными последовательностями, предположительно находящимися в сатДНК (Бирштейн, 1987). Организация генов рРНК высших эукариот имеет общие черты. Каждая повторяющаяся единица рДНК состоит из трех генов (кодирующих 28S, 18S и 5,8S рРНК), отделенных друг от друга спейсерными участками: двумя внутренними транскрибируемыми (ITS-1 и ITS-2) и двумя внешни-

I— транскрибируемым (ETS), а также наиболее длинным и вабельным нетранскрибируемым (NTS). Внешние спейсеры анкируют соответственно 18S- и 28S-кодирующие регионы. В ичие от консервативных кодирующих участков спейсеры, осояно нетранскрибируемые, эволюционируют быстро, преимуще¹енно за счет замены оснований, а также делеций, инсерций и дубликаций сегментов ДНК (Arnheim, 1983). Процесс их (инонов) вырезания носит название сплайсинга — постепенного аления всех промежуточных последовательностей из первичного продукта транскрипции с образованием ковалентно непрерывной РНК.

Большинство мутаций рДНК быстро фиксируется внутри пуляции или вида в процессе дифференциации. Это происходит с помощью так называемой согласованной эволюции с участием механизмов гомогенизации внутри генома и скрещивания утри менделевских популяций (Dover, 1982). Согласованная олюция (сопряженная эволюция, или коэволюция) — это когда а гена эволюционируют вместе как один локус. Такой эффект ожет достигаться разными путями. В одном случае мутация заагивает одну из копий, которая либо элиминируется (так как ее ункцию принимает на себя другая копия), либо распространяет⁴ на другую копию (так как мутантная копия становится доминантной и служит материалом для естественного отбора). В основном другого механизма лежит способность неаллельных генов надеваться не независимо, а воспроизводиться одной из копий едыдущего поколения. В любом случае нуклеотидные последовательности неаллельных генов непосредственно сравниваются друг с другом и приводятся к одному виду (т. е. «гомогенизируются» под действием ферментов, распознающих любые различия в оследовательности ДНК (Льюин, 1987).

Впервые гены рРНК ядер были использованы для филогенетических исследований лесных мышей японскими генетиками IjSuzuki et al., 1990). Для этого они провели блот-гибридизацию по 'аузерну гидролизованной 12 рестриктазами (включая парный ролиз) тотальной ДНК семи видов лесных и полевых мышей с емя радиоактивно меченными зондами генов рРНК: 28S, 12S и NT (рис. 21). Ключевой момент этой методики — денатурация ативной ДНК и перенос одноцепочечных фрагментов на нитроцеллюлозный фильтр, где они иммобилизуются. Так как процесс Переноса ДНК напоминает промокание (в английском языке —

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12



28S

18S

INT

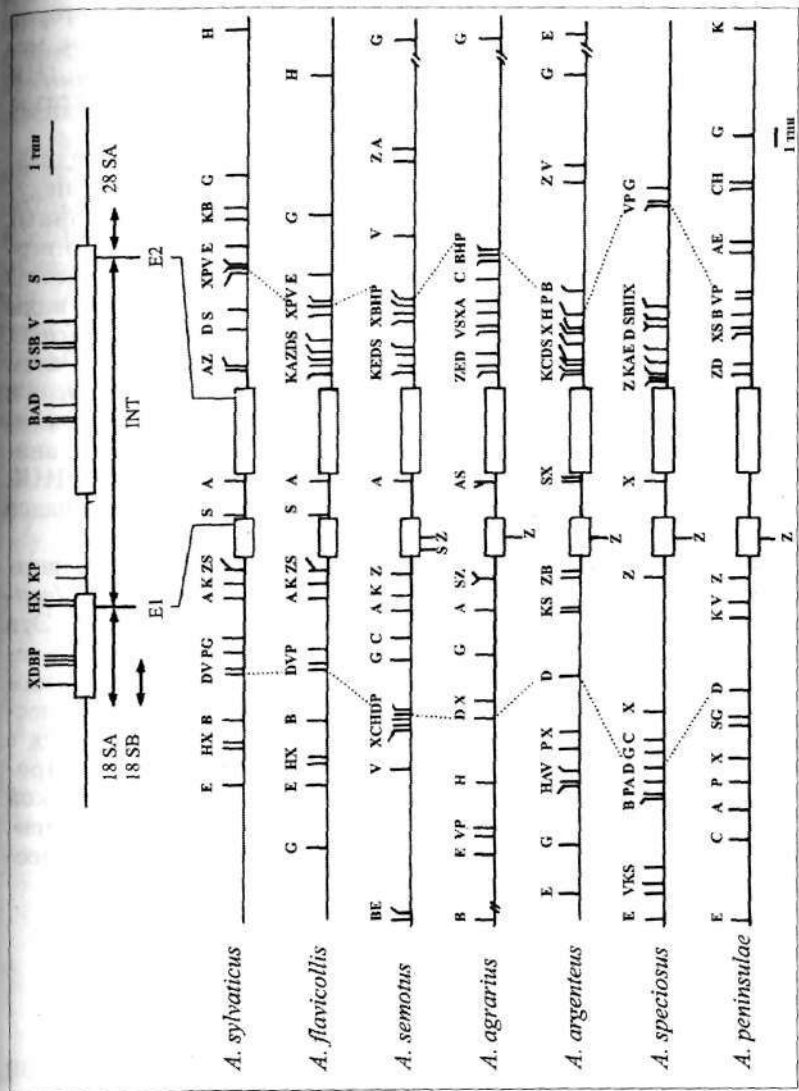


Рис. 22. Рестрикционные карты основного повтора рДНК лесных и полевых мышей (по: Suzuki et al., 1990)
 Fig. 22. Restriction maps of the major rDNA repetypes of wood and field mice (from: Suzuki et al., 1990)

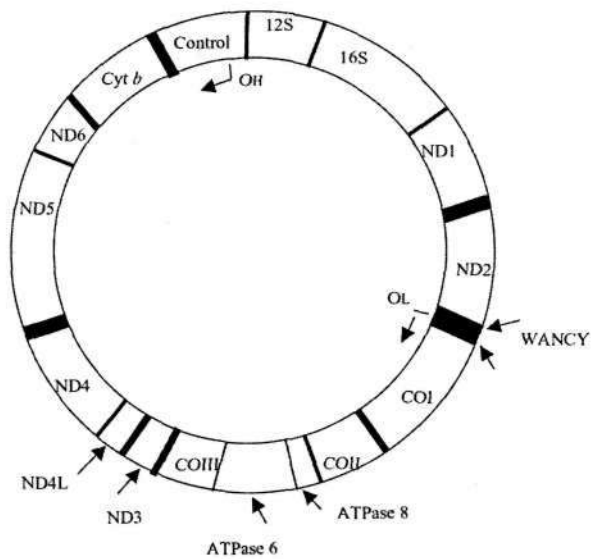
маркеров. Существует несколько способов картирования участком ДНК: одновременное расщепление несколькими рестриктазами; последовательное расщепление выделенного фрагмента второй рестриктазой; частичное расщепление немеченой ДНК или меченой по определенному концу; частичное расщепление ДНК эндонуклеазами с последующим расщеплением рестриктазой (Маниатис и др., 1984).

Как отмечают сами авторы цитированного выше исследования, учет лишь одного типа мутаций в некоторой степени спекулятивен, так как помимо замен оснований в анализированных сегментах происходят делеции, инсерции, дубликации и инверсии, а эволюционный вес различного рода мутаций не всегда ясен. Согласно полученным данным, проанализированные виды вначале дифференцировались на 5 групп: *S. sylvaticus*/*S. flavicollis*, *A. semotus*/*A. agrarius*, *A. argenteus*, *A. speciosus* и *A. peninsulae*. Затем разделились *A. semotus* и *A. agrarius*, а еще позже — *S. sylvaticus* и *S. flavicollis*. Как было отмечено в гл. 1 наст. работы, эти филогенетические реконструкции не имели полного совпадения с аналогичными построениями по данным ПДРФ суммарной яДНК. Вместе с тем они не обнаружили и явных противоречий, совпадая по ряду принципиальных положений.

В среднем все выявленные типы рДНК («repetypes») сравнимых видов дивергировали на 7 % (от 1 % для пары *S. sylvaticus*/*S. flavicollis* до 8,5 % для пары *S. sylvaticus*/*A. peninsulae*). Эти результаты соответствовали имеющимся данным дивергенции генов рРНК других видов грызунов (Yonekawa et al., 1981) и позволили оценить эволюционный возраст исследованной группы лесных и полевых мышей примерно в 10 млн лет, что согласуется с данными ПДРФ суммарной яДНК (см. гл. 1 в наст. работе). Проведенные исследования также показали отсутствие генетической базы для подразделения исследованных видов на два «экотипа»: полевых (*S. flavicollis*, *A. agrarius*, *A. speciosus* и *A. peninsulae*) и лесных (*S. sylvaticus*, *A. semotus* и *A. argenteus*) мышей.

2.2. Матриархальные связи лесных и полевых мышей по данным секвенирования участка гена цитохрома B мтДНК

Согласно эндосимбиотической теории, предложенной Г. Уоллином, а затем Л. Маргулисом, митохондрии возникли, когда протоэукариотическая клетка поглотила или была поглоще-



обычно менее 10 пн (Ojala et al., 1981). Опираясь на факт, что в геноме человека мтДНК с делецией может увеличиваться в частоте по сравнению с молекулой обыкновенного размера, предположили существование межмолекулярного отбора на компактность, проявляющуюся в экономичной организации генов (Kurland, 1992). Помимо содержания общих генов, выделяют следующие общие черты митохондриального генома позвоночных: концы некоторых генов имеют неполные стоп-кодоны, которые завершаются полиаденилированием; правила кодон-антикодон одни и те же, хотя частота их использования может отличаться; гуанин относительно редок в третьем положении кодона; некоторые гены, включая АТР-азу 6 и 8, перекрываются, в то время как другие тесно соседствуют; контрольный регион включает промотор транскрипции, а также начало репликации тяжелой цепи (Desjardins, Morais, 1990).

Митохондриальный геном животных имеет ряд привлекательных черт, таких как невысокая молекулярная масса (для млекопитающих — около 16 500 пн) (Avisé, Lansman, 1983), отсутствие повторяющихся последовательностей и межгенных спейсеров (Anderson et al., 1981; Barrell et al., 1980), консервативность расположения генов в молекуле (Anderson et al., 1981; Musser, Carleton, 1993), высокие скорости эволюции (в среднем в 10 раз выше, чем для уникальных последовательностей яДНК) (Brown et al., 1979; Cann et al., 1987). В настоящее время нет прямых указаний на то, что мтДНК может рекомбинировать (Clayton, 1982; Hayashi et al., 1985). Это означает, что мтДНК позвоночных передается по материнской линии по клональному способу, без горизонтального «смещения», что делает ее более приемлемой для реконструкции эволюционной истории этих молекул, по сравнению с ядерным геномом. В целом результаты исследований мтДНК могут представлять не только самостоятельный интерес, но также служить тестом для эволюционных гипотез, основанных на других признаках (более подробно см. обзоры: Челомина, 1987, 1989).

Тем не менее такой подход имеет некоторые ограничения. Во-первых, он применим для исследования лишь матриархальные связи, поскольку мтДНК наследуется строго по материнской линии (Brown et al., 1982; Hauswirth, Laipis, 1985). Согласно предложенной модели передачи мтДНК у млекопитающих (Hauswirth Laipis, 1985; Olivo et al., 1983), цитоплазматический генотип мо

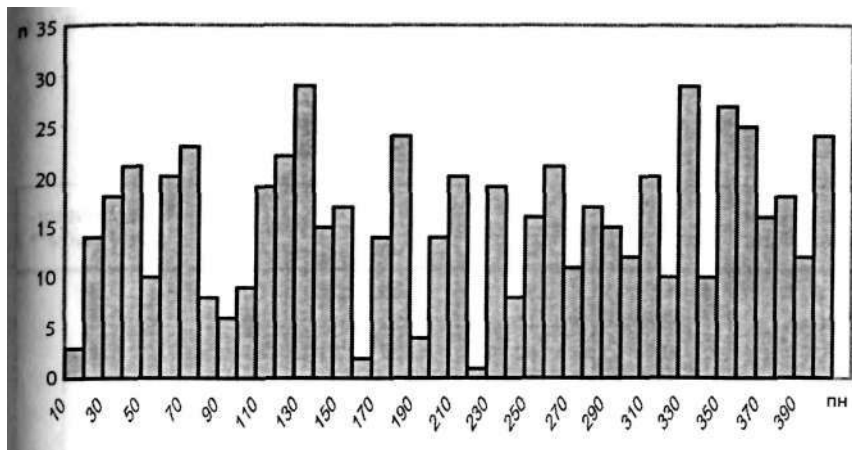
ует определяться всего пятью молекулами из предыдущей генерации. Возможность быстрого (за несколько поколений) образования и закрепления нового варианта генома обеспечивается гетероплазмией (при которой по крайней мере два типа митохондриального генома сосуществуют в одном индивидууме) некоторых клеток материнской линии и избирательной амплификацией в ходе оогенеза как мтДНК, так и митохондрий (Bermingham et al., 1986). Тем не менее в литературе встречаются сведения о других типах наследуемости мтДНК. Так, низкий уровень отцовских «линий» мтДНК обнаружен у гибридов домовых мышей (Gyllensten et al., 1991), показано двуполое наследование у некоторых межвидовых гибридов дрозофилы (Kondo et al., 1990). Такие особенности наследования митохондриального генома в сочетании с высокими скоростями эволюции позволяют фиксировать случаи интрогрессивной гибридизации (Ferris et al., 1983; Tegelstrom, U987). В результате система матриархальных связей, крайне необходимая для понимания общих процессов эволюции и филогении, не всегда адекватно отражает истинную ситуацию. Во-вторых, филогению мтДНК желательнее исследовать в пределах малых таксономических единиц (Brown et al., 1982). Так как высокие [скорости эволюции предполагают возможность гомоплазии (параллелизмы, конвергенции, возвратные замены), то чем продолжительнее время дивергенции таксонов, тем затруднительнее извлечение достоверной информации при сравнительном генетическом анализе. В связи с этим Неем и Ли (Nei, Li, 1979) было введено 5 %-ное ограничение уровня дивергенции для анализа последовательностей митохондриального генома. Это особенно важно учитывать при исследовании интенсивно размножающихся мелких грызунов с частой сменой генераций, к которым принадлежат лесные и полевые мыши, так как образование и закрепление нового варианта мтДНК возможно всего за несколько поколений (Hauswirth, Laipis, 1985).

Согласно современным представлениям использование в качестве молекулярного маркера в эволюционных и филогенетических исследованиях последовательности гена цитохрома *b* мтДНК является наиболее предпочтительным для количественной оценки степени генетической разобщенности родственных видов и создания для них корректной схемы эволюционных взаимоотношений. Хотя ясно, что филогения, опирающаяся на результаты сравнения

мтДНК, может отличаться от построенной не только традиционно (т. е. зоологической), но и по результатам исследований на уровне ядерного генома. Нуклеотидная последовательность участка гена цитохрома *b* мтДНК была определена нами для представителей девяти видов лесных мышей и одного — рода *Rattus* (*R. norvegicus*). Для филогенетического анализа использовали фрагмент первой половины белок-кодирующей области размером 402 пн с иницирующим кодоном АТГ. Синонимичность понятий «таксономический» и «биологический» вид для данной группы грызунов позволил оперировать таксономическими категориями при анализе конфигурации филогенетического древа и делать соответствующие систематические выводы.

Результаты показали, что эволюционно консервативные и лабильные последовательности анализируемого участка мтДНК каждого вида перемежаются неравномерно. По 20 позициям произошли «родоспецифичные» замены, разделяющие всех лесных мышей с серой крысой. Еще по 31 позиции мутировало более половины видов. Замены в 3 позициях (192, 348 и 354 пн) дифференцируют западно- и восточнопалеарктические виды. Примерно четверть инвариантных для лесных и полевых мышей нуклеотидных последовательностей гена цитохрома *b* сгруппирована в непродолжительные кластеры длиной 7—12 пн (позиции 1—8, 88—95, 152—164, 178—188, 211—221 и 262—268 пн нуклеотидов от иницирующего кодона). Аналогичной длины переменные кластеры отсутствуют, хотя можно выделить несколько зон повышенной мутации в пределах анализируемого участка мтДНК (рис. 24).

При сравнении полученных последовательностей выявлено, что большинство мутаций являются синонимичными, а общее число транзиций преобладает над числом трансверсий. В популяциях все замены являются синонимичными, с преобладанием С-Т-типа (62 % по сравнению с 38 % для замен типа А-Г). Замены типа трансверсий обнаружены только при межвидовом и межродовом сравнении. Как и в межпопуляционном анализе, при таком варианте сравнения чаще всего (51 % всех замен) регистрировались С-Т-транзиции. Сопоставление характера замен в позициях, отличающих все (или 8 из 9) виды лесных мышей от внешней группы (так называемые родоспецифичные сайты), выявило преобладание в них трансверсий (в основном типа С-А), а также более высокое содержание G-C- и (особенно) G-T-замен



**Характер нуклеотидных замен в области гена цитохрома *b* мтДНК
(по: Челомина и др., 1998а)
Types of nucleotide substitutions in mtDNA cytochrome *b* gene
(from: Chelomina et al., 1998a. — Russian)**

| Типы замен оснований | Лесные и полевые мыши | | | Кошачьи* | Подкаменциковые рыбы** |
|---------------------------|-----------------------|------|------|----------|------------------------|
| | Популяции | Виды | Роды | | |
| C-T | 62 | 51 | 15 | 60 | 35 |
| G-A | 38 | 11 | 22 | 20 | 43 |
| | 100 | 62 | 37 | 81 | 78 |
| C-A | 0 | 26 | 42 | 9 | 20 |
| T-A | 0 | 11 | 17 | 6 | 1 |
| G-C | 0 | 1 | 1 | 1 | 1,5 |
| G-T | 0 | 1 | 3 | 2 | 1 |
| | | 38 | 63 | 19 | 22,5 |
| Транзиции/ трансверсии | | 1,63 | 0,87 | 4,26 | 3,55 |

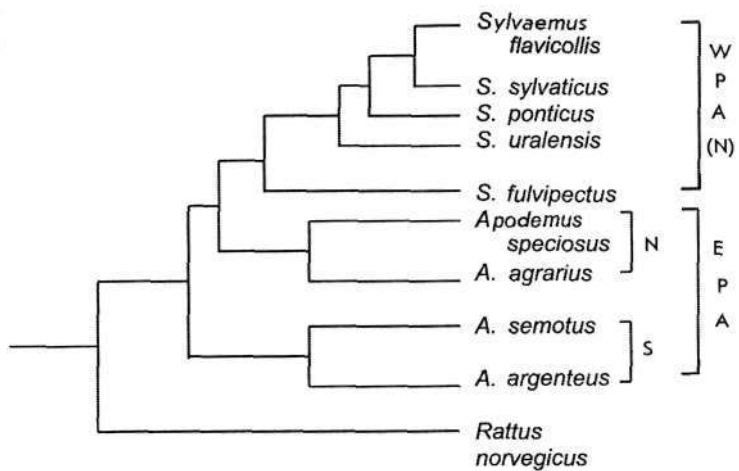
* По данным Масуды с соавторами (Masuda et al., 1994).

** По данным Кирильчик с соавторами (1995).

люционный возраст самой молодой пары видов (*S. ponticus*/*S. /lavicollis*) оценивается примерно в 2,5 млн лет, а всей еврокавказской группы — в 4 млн лет.

Для филогенетических реконструкций использовали все точковые мутации. Топология филогенетической схемы (рис. 25) в целом отражает деление лесных мышей на три группы: 1) южнопалеарктическую (*A. argenteus*, *A. semotus*), 2) восточную (*A. agrarius*, *A. speciosus*) и 3) западную (*S. sylvaticus*, *S. flavicollis*, *S. uralensis*, *S. ponticus*, *S. fulvipectus*) Северной Палеарктики. Южнопалеарктические (азиатские) виды являются наиболее отдаленными, что может свидетельствовать об их более древнем происхождении, и предковыми для обеих ветвей северопалеарктических видов лесных мышей.

Из результатов сравнения последовательностей ясно, что гены цитохрома *b* мтДНК мелких грызунов эволюционируют быстро. Скорость их эволюции, видимо, выше, чем у средних и круп-



(Aquadro, Greenberg, 1983). Видимо, поэтому в родоспецифичных сайтах анализируемого участка мы наблюдаем повышенное (по сравнению с суммарным) количество трансверсий. Тип транзиций и трансверсий тоже не случаен. По крайней мере для мтДНК млекопитающих (как мышей, так и хищников) предпочтительным типом транзиций являются С-Т-, а трансверсий — С-А-замены. Самыми дефицитными типами замен у всех изученных животных являются G-С- и G-Т-трансверсии (Wayne, Jenks, 1991; Hosoda et al., 1995, 1997; Masuda et al., 1994; Masuda, Yoshida, 1994a,b, 1995; Кирильчик и др., 1995).

Локализация замен в определенных для группы видов сегментах мтДНК, возможно, обязана селективной природе мутаций. Ранее, анализируя факты неслучайности замен в мтДНК грызунов, копытных и человека (Brown, Simpson, 1982), авторы предположили, что эта черта может быть общей как для кодирующих, так и не кодирующих областей (Aquadro, Greenberg, 1983). Высокие значения молчащих замен по отношению к смысловым, полученные в данной работе, также являются типичным проявлением свойств мтДНК млекопитающих (Brown et al., 1982; Ferris et al., 1983) и могут свидетельствовать о фиксации последних на том же уровне или ниже, чем в генах яДНК (Brown et al., 1982).

Реконструированное молекулярно-филогенетическое древо, отражающее матриархальные связи видов лесных и полевых мышей, в целом согласуется с аналогичными построениями, основанными на анализе ПДРФ суммарной яДНК (см. гл. 1 в наст. работе). Оба подхода дифференцируют лесных мышей на три группы: южнопалеарктическую, а также восточную и западную Северной Палеарктики. Примечательно, что наблюдается полное совпадение деления видов на группы по сходству их митохондриального генома с делением этих же видов по типам внешней сегментации последовательностей сатДНК. Этот факт позволяет сделать заключение о согласованности механизмов молекулярной эволюции высоких повторов ДНК ядерного генома и индивидуальных генов мтДНК лесных и полевых мышей, а также предполагать отсутствие определяющего влияния на этот процесс межвидовой интрогрессивной гибридизации, если она имела место в истории данной группы видов.

Однако филогенетические реконструкции по данным ПДРФ рДНК ядер (Suzuki et al., 1990) отличаются от полученных в настоящей работе как последовательностью ветвления, так и характером кластеризации видов, в том числе отсутствием дифференциации азиатских лесных мышей на северо- и южнопалеарктические группы. Несовпадение филогении, базирующихся на данных высокочувствительных и хорошо себя зарекомендовавших методов (анализа ПДРФ геномной ДНК и первичной последовательности индивидуальных генов), может быть проявлением особенностей механизмов эволюции (прежде всего — типа наследуемости) сравниваемых участков ядерного и цитоплазматического геномов, включая зависимый от ядра селективный отбор определенных типов мтДНК (Ferris et al., 1983; White, Bunn, 1984), а также результатом различной эволюционной значимости взвешиваемых признаков. Кроме того, такая противоречивость может, видимо, отражать непростую историю лесных и полевых мышей, предполагаемая как возможность гибридного формообразования, так и полифилетическое происхождение. Различия в топологии древ могут также быть в определенной мере связаны с использованием для указанных молекулярно-генетических анализов различных наборов видов исследуемого таксона.

Несовпадение филогении, базирующихся на признаках ядерного и цитоплазматического геномов, наблюдали также при изучении других групп животных. Возможной причиной несоответствия филогении мтДНК и уникальных последовательностей ядерного генома белоглазок (род *Zosterops*) Австралии считают недавнюю межвидовую гибридизацию, свидетельства которой в ядерном геноме «стерты» многочисленными рекомбинациями (Degnan, 1993). Различия в филогении ядерной и митохондриальной ДНК слепышей рода *Spalax* связывают с сохранением у этих видов предкового полиморфизма мтДНК в противоположность высокой меж- и внутривидовой гомогенизации генов ядерной рДНК (Suzuki et al., 1996).

В некоторых таксонах топология древ, сконструированных по данным нуклеотидной последовательности гена цитохрома *b* мтДНК и ПДРФ ядерной рДНК, совпадала, но уровни дивергенции видов и их эволюционный возраст, оцененный по этим двум критериям, существенно различались. Например, максимальное

значение генетических дистанций трех видов *Mustela* по данным секвенирования участка гена цитохрома *b* мтДНК и ПДРФ рДНК ядер составляет соответственно 6,9 и 1,2 % (Hosoda et al., 1993; Masuda, Yoshida, 1994a,b). Таким образом, время дивергенции видов в первом случае оценивается примерно в 3 млн лет, в то время как для второго метода оно чуть выше 1 млн. Для рода *Martes* эти различия еще выше: 2,6–6,2 % дивергенции по данным секвенирования участка гена цитохрома *B* (т. е. 1–2,5 млн лет дивергенции) и 0,1–0,4 % дивергенции по данным ПДРФ рДНК ядер (т. е. 0,1–0,4 млн лет дивергенции) (Masuda, Yoshida, 1994a,b; Hosoda et al., 1993). В нашем примере эволюционный возраст «*Apodemus*» по данным ПДРФ ядерной рДНК (примерно 10 млн лет) (Suzuki et al., 1990) превышает значения, полученные на уровне мтДНК (около 6 млн лет).

Как мы уже отмечали, при вычислении генетических дистанций по данным анализа изменчивости мтДНК для наиболее дивергировавших пар видов возможно частичное занижение соответствующих значений, если в качестве молекулярного маркера использована быстро эволюционирующая последовательность. Сходная взаимная близость видов в филумах азиатских видов на фоне их высокой генетической дивергенции, а также всего лишь 2-кратное превышение генетических дистанций азиатских видов по сравнению с еврокавказскими, противоречащее устоявшимся представлениям о значительно более высоких различиях между ними (Межжерин, Зыков, 1991; Межжерин и др., 1992), вероятно, в определенной мере обязаны именно этому обстоятельству. В какой-то мере реальность такой возможности, с нашей точки зрения, находит подтверждение в результатах сравнительного изучения филогении кошачьих на уровне различных генов мтДНК (Masuda et al., 1994). Авторы отмечают, что анализ характера мутаций свидетельствует о более высоких скоростях эволюции генов цитохрома *b* по сравнению с генами 12S рРНК. Эти различия более чем 1,5-кратны, так как дивергенция одних и тех же видов по данным секвенирования 12S рДНК составляет 1,6–5,6 %, а участка гена цитохрома *b* — 6,7–13,7 %. Кроме того, в последнем варианте относительные дистанции между наиболее дивергировавшими видами ниже: они всего в 2 раза превышают минимальные, в то время как в первом варианте превышение более чем 3-кратно. Альтернативными объяснениями этим результатам

могут быть как непостоянство скоростей эволюции, так и неслучайный характер мутаций.

Все проанализированные нами виды превышают 5 %-ный уровень дивергенции: самые низкие значения составляют 6,4 %. Указанное ограничение соблюдается лишь при внутривидовом анализе (*A. speciosus*), где эти значения не превышают 3,73 %, хотя и достигают уровня межвидовых генетических дистанций других млекопитающих (Wayne, Jenks, 1991; Hosoda et al., 1995). Таким образом, если учитывать вышеуказанную поправку, то наиболее достоверными следует считать данные генетических дистанций между видами эволюционно наиболее молодой, т. е. западнопалеарктической группы.

Достаточно высокий уровень межвидовой дивергенции гена цитохрома *b* мтДНК отмечен практически для всех исследованных к настоящему времени животных (в основном представителей отряда Carnivora) (Wayne, Jenks, 1991; Hosoda et al., 1995, 1997; Masuda et al., 1994; Masuda, Yoshida, 1994a,b). Тем не менее в целом он ниже среднего уровня дивергенции лесных и полевых мышей. Так, межвидовая дивергенция рода *Mustela* составляет 4,3–16,8 %, но если исключить самый дивергировавший вид, без которого оставшиеся виды могут считаться монофилетической группой, то верхний предел уровня дивергенции снизится почти вдвое, т. е. до 8,3 % (Masuda, Yoshida, 1994a,b). Виды рода *Martes* дивергировали между собой на 2,6–6,2 % (Hosoda et al., 1997; Masuda, Yoshida, 1994a,b), т. е. примерно на том же уровне, что и виды рода *Canis*: 5,3–6,1 % (Wayne, Jenks, 1991). У представителей самого многочисленного среди семейства кошачьих рода *Felis* уровень межвидовой дивергенции колеблется в более широких пределах — от 0,5 до 11,9 % (Masuda et al., 1994). Значения межвидовых генетических дистанций Carnivora в целом составляют 11,4–16,8 % (т. е. как между азиатскими лесными мышами), а их различия с внешней группой достигают 20,5 % (Masuda et al., 1994). В то же время уровень даже межродовых генетических дистанций подкаменщиковых рыб оз. Байкал не превышает 5,5 % (Кирильчик и др., 1995).

Полученная топология видов соответствует таксономической (зоологической) классификации лесных мышей лишь в той ее части, которая объединяет (причем по единодушному мнению зоологов) лесных мышей западнопалеарктической фауны в один

подрод *Sylvaemus* (т. е. за исключением *A. mystacinus*) (Corbet, 1978; Громов, Баранова, 1981; Павлинов и др., 1995). Деление азиатских видов по сходству их мтДНК на две группы, напротив, контрастирует со всеми известными на сегодняшний день зоологическими системами классификации *Apodemus*, в основном объединяющими эти виды в один подрод *Alsomys*. Причисление полевой мыши *A. agrarius* вместе с восточноазиатской и японской лесными мышами *A. peninsulae* и *A. speciosus* к одному подроду большинством зоологов также не поддерживается. Они отдают предпочтение выводу *A. agrarius* в подрод *Apodemus* (вместе с *A. chevri-eri*) (Musser, Carleton, 1993; Corbet, 1978; Громов, Баранова, 1981; Павлинов и др., 1995). Таким образом, принципиально новый и важный момент полученных нами результатов заключается в строгой дифференциации между собой азиатских видов на севере- и южнопалеарктическую группы.

Плезиоморфность большинства объединяющих признаков позволила российским зоологам допустить возможность парафилетического происхождения северопалеарктических грызунов, объединяемых в секцию «*Apodemus*» (Павлинов и др., 1995). На основании данных сравнительной морфологии, цитогенетики и биохимического тестирования авторы пришли также к выводу о целесообразности присвоения подкладам *Apodemus* и *Sylvaemus* родового статуса. Из полученных нами результатов вряд ли можно сделать определенный вывод относительно числа исходных форм исследуемого таксона. Однако они ясно указывают, что в его формировании по материнской линии могли принимать участие по крайней мере три типа мышей-родоначальниц каждой из трех групп (филумов). Мы полагаем, что высокая дифференциация каждого филума как по мтДНК, так и по высокоповторяющейся яДНК (см. гл. 1 в наст. работе) вполне может служить поводом для пересмотра их таксономического статуса, тем более что деление на филумы совпадает с высокой морфологической, кариологической и биохимической дифференциацией (Межжерин, Зыков, 1991; Межжерин и др., 1992; Павленко, 1990; Bekasova et al., 1980; Pavlenko, 1995).

Известно, что географическое распределение некоторых типов мтДНК в популяциях животных оказывается тесно связанным с историей расселения видов (Avise, Lansman, 1983; Moritz et al., 1987). Экстраполируя эту закономерность на более высокий

таксономический уровень, можно предположить, что виды «*Apodemus*» имеют южноазиатское происхождение, а заселение Северной Палеарктики лесными мышами шло с юга по двум направлениям: восточному и западному. Являясь более длительным, западный путь смог обеспечить формообразование в эволюционном отношении наиболее молодой и поэтому генетически менее дифференцированной, но более многочисленной группы видов, объединяемой ныне отечественными зоологами в род *Sylvaemus*. Более древний путь оставил высокодивергировавшую группу видов, объединение которой даже в два таксона подродового ранга, Кто мы имеем на сегодняшний день, представляется весьма сомнительным.

Таким образом, в целом данные по структуре и эволюции индивидуальных генов мтДНК хорошо дополняют наши представления о филогении, истории эволюции и зоогеографии лесных мышей. Цитоплазматический геном может служить надежным маркером в дальнейших филогенетических исследованиях и быть весьма полезным при таксономической ревизии лесных и полевых мышей, которые представляются нам на данный момент в ранге надродовой группировки. Тем не менее следует учитывать возможность занижения генетических дистанций для высокодивергировавших пар видов при использовании в качестве молекулярного маркера быстро эволюционирующего гена цитохрома *b* мтДНК. В таких случаях считается более корректным

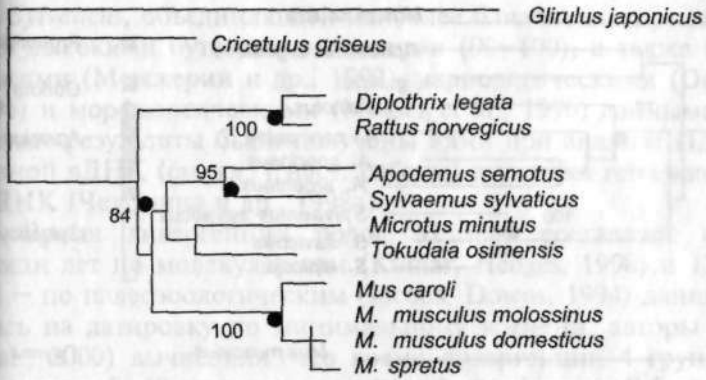
- использование только одного типа мутаций — трансверсий. Не-
- Полное совпадение молекулярной филогении, выведенной по данным изменчивости последовательности участка гена цитохрома *b* мтДНК и по результатам анализа ПДРФ рДНК ядер, видимо, следует расценивать как свидетельство сложного эволюционного пути лесных и полевых мышей, включая особенности молекулярной эволюции и формообразовательных процессов (пара/полифилия, гибридизация). Вместе с тем согласованность ключевых положений полученной в настоящей работе филогении с выведенной по данным ПДРФ высокоповторяющейся яДНК может свидетельствовать о единой эволюционной стра-
- Тегии видов лесных и полевых мышей на уровне ядерного и митохондриального геномов, как бы сложно ни проходили их видообразование и эволюция.

2.3. Филогенетические связи и видовая радиация представителей родов *Sylvaemus* и *Apodemiis* по данным двух белок-кодирующих генов (IRBP яДНК, сyt B мтДНК)

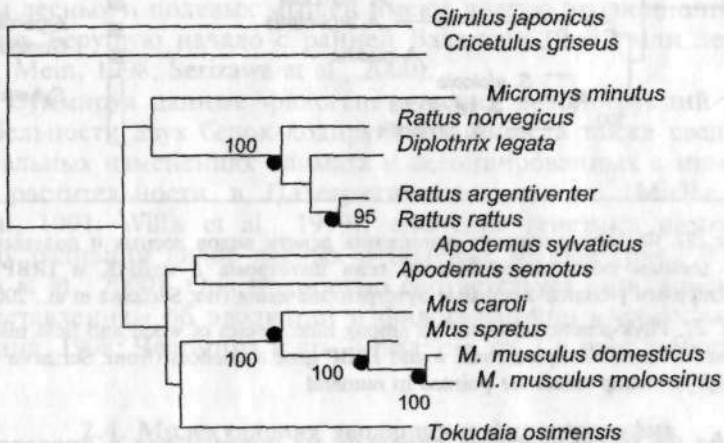
Особенности молекулярной эволюции и филогении лесных и полевых мышей были продолжены японскими коллегами с использованием в качестве молекулярного маркера полной последовательности (1140 пн) гена цитохрома B мтДНК и гена (1152 пн) интерфоторецепторного ретиноидсвязывающего белка (IRBP) яДНК (Serizawa et al., 2000). Если цитохромовый ген к тому времени был уже общепризнанным филогенетическим маркером, то IRBP-ген яДНК был использован всего в нескольких работах: по исследованию различных отрядов млекопитающих (Stanhope et al., 1992, 1996; Springer et al., 1997), а также для определения взаимоотношений родственных видов грызунов (Suzuki et al., 2000). Именно в последней из цитированных работ авторы доказали, что эндемик о-ва Окинава *Tokudaia osimensis* является сестринским видом лесных и полевых мышей (рис. 26). По морфологии зубов этот грызун проявляет высокое сходство с ископаемым прототипом *Apodemiis*, названным *Parapodemus*, — гораздо большее, чем с другими тропическими видами *Murinae* и имеет (в отличие от современных представителей «*Apodemus*») жесткий волосяной покров (Kawamura, 1989).

Данные анализа двух независимых генов подтвердили существующие представления о продолжительной эволюционной истории азиатских и относительно недавней — европейских видов. В ходе этого анализа мыши были разделены на 4 филогенетические группы: 1) *A. argenteus*, 2) *A. gurkha*, 3) группа *Apodemus* (*A. agrarius*, *A. peninsulae*, *A. semotus* и *A. speciosus*) и 4) группа *Sylvaticus* (*S. alpicola*, *S. flavicollis* и *£ sylvaticus*) (рис. 27). Такое деление полностью соответствует проведенному нами (см. гл.1 наст. работы): *Sylvaticus*=«*Rattus*», *Agrarius*—«*Apodemus*», *Argenteus*=«*Mus*», гималайская мышь *A. gurkha* в наших исследованиях отсутствовала.

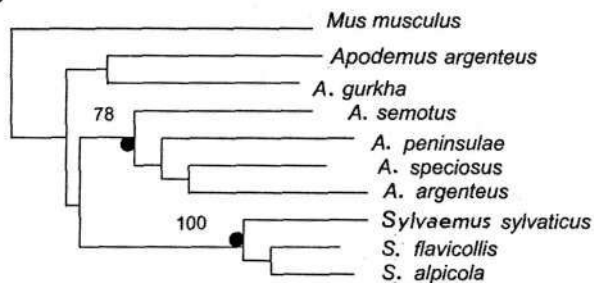
В цитируемом исследовании южнопалеарктическую фауну представляли два вида: *A. argenteus* и *A. gurkha*, хорошо дифференцированные с остальными азиатскими видами. Но бутстреп-поддержка их монофилетичности не превышала 50. Топология



cyt b



cyt b



Γ pynna

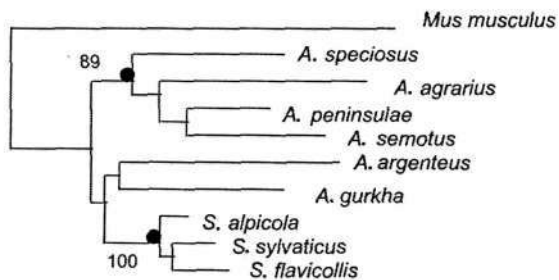
Argenteus

Gurkha

Agrarius

Sylvaticus

IRBP



Γ pynna

Agrarius

Argenteus

Gurkha

Sylvaticus

и морфологического (Musser et al., 1996) анализом: бутстреп-оценки составляют 58—94. Монофилетичность европейской группы *Sylvaticus*, объединяющей наиболее близкие виды, подтверждаются высокими бутстреп-значениями (99—100), а также биохимическими (Межжерин и др., 1992), кариологическими (Orlov et al., 1996) и морфологическими (Musser et al., 1996) данными. Аналогичные результаты были получены нами при анализе ПДРФ суммарной яДНК (см. гл. 1 наст. работы) и участка гена цитохрома *b* мтДНК (Челомина и др., 1998а).

Время дивергенции родов Murinae составляет примерно 40 млн лет по молекулярным (Kumar, Hedges, 1998) и 12—14 млн лет — по палеозоологическим (Jacobs, Downs, 1994) данным. Опираясь на датировку по минимальному времени, авторы (Serizawa et al., 2000) вычислили, что время дивергенции 4 групп мышей составляет 8—10 млн лет, виды групп *Apodemus* и *Sylvaticus* разделились соответственно 7—8 и 2—4 млн лет назад. Эти выводы соответствуют палеонтологическим данным, утверждающим, что виды лесных и полевых мышей имеют долгую эволюционную историю, берущую начало с ранней Валенсии (9—12 млн лет) (Suarez, Mein, 1998; Serizawa et al., 2000).

Суммируя данные филогенетических реконструкций по варибельности двух белок-кодирующих генов, а также сведения о глобальных изменениях климата и ассоциированных с ними сменах растительности в Палеарктическом регионе (Mielke, 1989; Tanai, 1991; Willis et al., 1999), японские генетики разработали схему радиации видов лесных и полевых мышей (рис. 28) (Serizawa et al., 2000). Она полностью соответствует описанным нами представлениям об эволюции и филогеографии «*Apodemus*» (Челомина, 1998; Челомина и др., 1998а; см. гл. 1 в наст. работе).

2.4. Молекулярная эволюция и филогеография западнопалеарктических лесных мышей рода *Sylvaemus*

Род *Sylvaemus* объединяет до 12 различных видов (см. табл. 1): *S. sylvaticus*, *S. flavicollis*, *S. alpicola*, *S. uralensis*, *S. fulvipectus*, *S. hyrcanicus*, *A.(S). arianus*, *A.(S). hermonensis*, *S. rusiges*, *S. wardi*, *S. ponticus*, принадлежащих одноименному подроду *Sylvaemus* s.str., а также *A. (S). mystacinus*, представляющую монотипический подрод

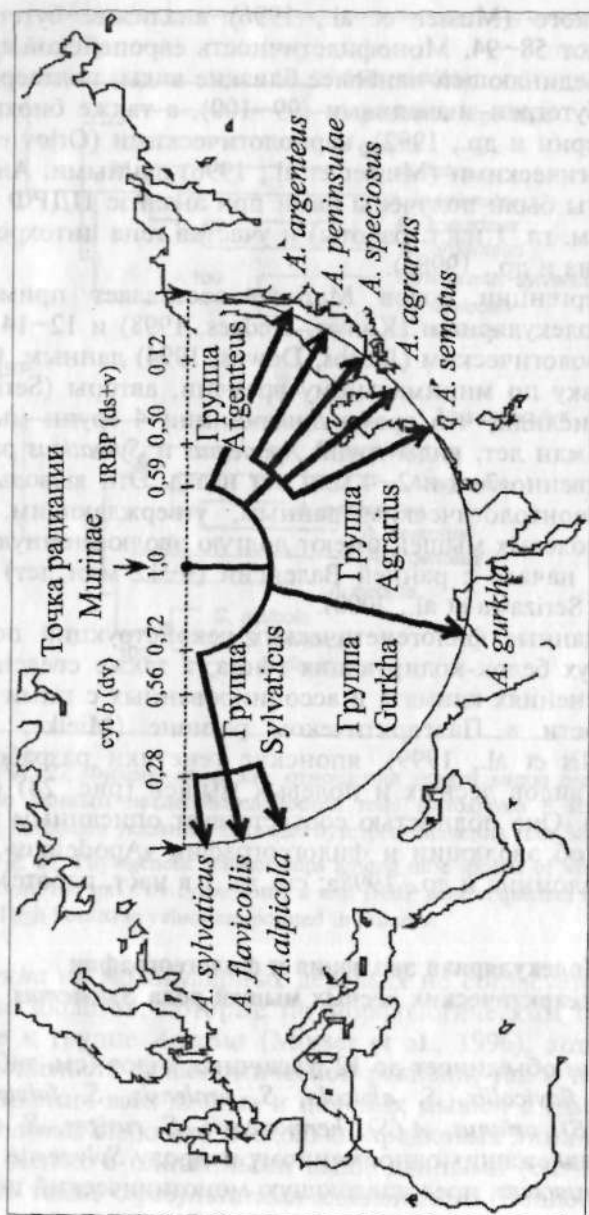


Рис. 28. Схема дивергенции четырех групп «Arodemus» по данным изменчивости генов IRBP яДНК и цитохрома *b* мтДНК (по: Serizawa et al., 2000)

Fig. 28. Schematic representation for the divergences of the four «Arodemus» groups inferred from both nDNA IRBP and mtDNA *cyt b* genes variation (from: Serizawa et al., 2000)

rustomys (Павлинов и др., 1995; Пантелеев, 1998). В настоящее время эта группа грызунов является одной из наиболее интенсивно изучаемых таксонов мелких млекопитающих. Выполнено большое число работ с привлечением традиционных морфометрических и цитогенетических методов исследования, продемонстрировавших высокое фенотипическое и кариологическое сходство видов *Sylvaemus* (Zima, 1984; Bulatova et al., 1991; Nadjafova et al., 1993; Michaux et al., 2001). Исследования методами биохимической генетики подтвердили их тесные эволюционные связи и позволили решить ряд таксономических проблем (Csaikl et al., 1980; emmeke, 1980; Britton-Davidian et al., 1991; Filippucci et al., 1996; artl et al., 1992; Межжерин, Зыков, 1991). К сожалению, все они оказались недостаточно эффективными для уточнения филогенетических связей и создания современной системы классификации лесных и полевых мышей. Более успешны были новые молекулярные методы: RFLP, RAPDs и секвенирование индивидуальных фрагментов ядерного и митохондриального геномов (Tegelstrom, arala, 1989; Suzuki et al., 1990; Челомина, 1993а,б; Челомина, 1996, 1998; Челомина и др., 1998а; Michaux et al., 1996, 2002; Belfovia et al., 1999; Martin et al., 2000; Serizawa et al., 2000). Начало того направления исследований было положено в 1975 г., когда Кук впервые провел рестрикционный анализ яДНК четырех видов лесных и полевых мышей (Cooke, 1975). Тем не менее есть основания считать, что до сих пор филогенетические отношения среди 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 лесные мыши не были представлены в полном объеме. Вместе с тем исследования филогенетических связей видов, позволяющие дать описание реальной картины процесса видообразования во времени особенно актуальны, так как они важны при решении фундаментальных теоретических задач, и прежде всего потому, что классическая точка зрения о видообразовании, рассматриваемом в качестве вероятностного генетического процесса, протекающего на популяционном уровне, в настоящее время замещается типологическим подходом (Межжерин, 1997). Это, в свою очередь, предполагает качественные различия природы эволюционных

генных трансформаций и генетического полиморфизма (Алтухов, Рычков, 1972; Межжерин, 1997).

В целях уточнения филогенетических связей и разработки новой филогеографической концепции западнопалеарктических лесных мышей мы совместно с японскими коллегами проанализировали характер генетического разнообразия семи видов рода *Sylvaemus* (*S. sylvaticus*, *S. flavicollis*, *S. ponticus*, *S. fulvipectus*, *S. a/picola*, *S. uralensis*, *S. mystacinus*) с решением следующих основных задач: 1) анализ особенностей молекулярной организации и эволюции гена цитохрома *b* мтДНК и гена IRBP яДНК, имеющих различные типы наследования и скорости эволюции; 2) оценка уровней дивергенции; 3) сопоставление филогенетических связей и 4) филогеографические реконструкции для видов западнопалеарктических лесных мышей по данным двух молекулярных маркеров (Челомина, Сузуки, 2004).

У всех изученных таксонов последовательность цитохромового гена мтДНК начинается с консервативного метионинового кодона АТГ и не содержит внутри себя стоп-кодонов, в отличие, например, от серой крысы и некоторых полевков (Martin et al., 2000). Его полная 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 GСС 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 гена цитохрома *b* мтДНК проанализированных видов (табл. 7) 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 А, Т и С (31,7, 29,4 и 26,6 % соответственно). Кроме этого частота гуанина резко отличается 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

иведем усредненные литературные данные состава оснований на цитохрома *b* 18 видов мышевидных грызунов, включая некоторые из анализируемых нами таксонов: G=12,8 %, A, T и C — от 7,7 до 30,8 %. Содержание гуанина в первом, втором и третьем оложениях кодона равно 22,3, 12,9 и 3,1 % соответственно (Magl et al., 2000).

Таблица 7

Распределение азотистых оснований и мутационных замен (в %) в двух белок-кодирующих генах лесных мышей рода *Sylvaemus* (по: Челомина, Сузуки, 2004)
Distribution of nitrous bases and nucleotide substitutions (%) in two protein coding genes of wood mice of the genus *Sylvaemus* (from: Chelomina, Suzuki, 2004. — Russian)

| Азотистое основание | Ген IRBP яДНК | | | | Ген цитохрома <i>b</i> мтДНК | | | |
|---------------------|----------------|------|------|------|------------------------------|------|------|------|
| | Позиции кодона | | | % | Позиции кодона | | | % |
| | 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. Ts - транзиции, Tv - трансверсии; Vs - вариабельные сайты.

Анализ состава оснований гена IRBP (табл. 7) выявил высокое, примерно 60 %, 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 отличается. 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 грызу-

нов 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 % 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 авторов цитированного выше исследования, выявленные особенности в распределении нуклеотидов (т. е. повышенное содержание G+C) не имеют филогенетической значимости.

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 высоко 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 переменными — парсимоний-неинформативными и 16 — информативными. Для полной последовательности гена цитохрома *b* мтДНК выявлено признаков: 777 — инвариантных, 71 — переменных, являющихся парсимоний-неинформативными, и 292 — информативных.

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 переменной, чем первая и вторая: здесь локализовано 82,2 % транзиций и 95 % трансверсий (см. табл. 7). Внутри 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 переменных позиций (замен оснований) в первом положении ко-

дона составляет 10 и 23,9 %, втором - 1,4 и 30,6 %, а третьем - 88,6 и 45,6 % соответственно. Хотя в обоих случаях наиболее изменчивыми и дающими больший филогенетический сигнал является третьи позиции кодонов, наименее изменчива у митохондриального гена вторая 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. 8). 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).

Таблица 8

Генетические дистанции и отношения транзиций к трансверсиям (Ts/Tv) I по данным варибельности двух белок-кодирующих генов лесных и полевых мышей
Genetic distances and transition/transversion relations (Ts/Tv) based on the data of two wood and field mice genes variation

| Сравниваемые таксоны | Ген 1RBP яДНК | | | Ген цитохрома <i>b</i> мтДНК | | |
|--|---------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------|
| | Ts/Tv | K2P Ts+Tv | K2PTv | K2P Ts+Tv | K2PTv | Ts/Tv |
| <i>Sylvaemus</i> (внутри видов) | 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 |
| <i>Sylvaemus</i> (между видами) | 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 |
| <i>Sylvaemus</i> / <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 |
| <i>Sylvaemus</i> / <i>A. mystacinus</i> | | | | 0,17813 (0,1671- 0,1898) | 0,05367 (0,0665- 0,0756) | 1,4 |
| <i>A. agrarius</i> / <i>A. mystacinus</i> | | | | 0,18451 (0,1842- 0,1852) | 0,06752 (0,0665- 0,0685) | 1,5 |

Примечание. K2P - двухпараметрические дистанции Кимуры; в скобках указан диапазон изменчивости.

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 ситуация 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 составляет не больше двух, а мутации представлены главным образом синонимичными традиционными 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, Дж. Мишо с соавторами (Michaux et al., 2002) полагают, что, вероятнее всего, в работе Я. Мартина с коллегами (Martin et al., 2000) был использован в качестве последовательности гена цитохрома *b* мтДНК ядерный псевдоген. Заманчивым, с нашей точки зрения, представляется объяснить это явление межвидовой гибридизацией (периодически оспариваемой в связи с запутанностью систематики лесных мышей) как первопричиной внутригеномного полиморфизма. Действительно (и мы уже об этом упоминали), 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. содержанием разных гаплотипов мтДНК (Hauswirth, Laipis, 1985).

Для исследованной группы мышей были вычислены попарные абсолютные (суммарные и отдельно для замен типа трансверсий и транзиций) и относительные генетические дистанции, скорректированные согласно двупараметрической модели Кимуры (Kimura, 1980), а также гомоплазии. Внутри подрода *Sylvaemus* относительные межвидовые генетические дистанции Кимуры составляют в среднем 0,11306 (находясь в пределах 0,03067—0,14398) и 0,00897 (варьируя в диапазоне 0,00351—0,01320) 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 *A. mystacinus* (подрод *Karstomys*) или *A. agrarius*

(подрод *Apodemus*), причем межродовые и межподродовые дистанции оказываются практически равными (см. табл. 8).

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 подроде *Sylvaemus* — *S. fulvipectus*. Сравнение этих результатов с литературными данными, базирующимися на исследованиях маркерных генов, 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* (Michuax et al., 2002), *S. alpicola* и *S. sylvaticus* (Martin et al., 2000), *S. alpicola* и *MS. flavicollis* (Serizawa et al., 2000). Мы считаем это закономерным, потому что разные исследовательские группы анализировали различные наборы видов и пользовались разными модификациями при обработке оригинальных данных. Здесь следует заметить, что **они** в одну из перечисленных работ (кроме наших исследований) не были включены ни *S. ponticus*, ни *S. fulvipectus*. В то же время горная малазийская мышь *A. mystacinus* дифференцируется с видами подрода *Sylvaemus* на уровне внешней группы во всех (Martin et al., 2000; Michuax et al., 2002) исследованиях, включая наши.

Как известно по первому из маркеров (цитохромовому гену мтДНК), генетические дистанции внутри родов отряда Rodentia могут иметь высокие значения 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, их верхние границы 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 данным, дивергенция генов цитохрома *b* мтДНК и гена IRBP яДНК между видами «*Apodemus*», а также между другими 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 литературным источникам эти величины равны (при исключении транзиции в третьей позиции кодона цитохромового гена) 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, все имеющиеся результаты вполне сопоставимы между собой.

Из чисто теоретических умозаключений следует, что вряд ли исключение транзиций (даже только в третьей позиции кодона) следует считать оправданным при филогенетических исследованиях данной группы грызунов. Известно, что скорость эволюции митохондриальной ДНК 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 как в собственной работе, так и в исследованиях других авторов, учитывающих при определении генетических дистанций все типы замен во всех положениях кодона. Однако это соотношение нарушается при сравнении таксонов, расположенных на иерархической лестнице выше. Но исключение транзиций не исправляет положения — лишь снижает (хотя и неравномерно) общий уровень значений генетических дистанций. В таком случае, действительно, соотношение уровней межвидовой и межродовой дивергенции более адекватно. Поскольку основная наша задача заключалась в исследовании отношений видов внутри рода, были все основания для использования полного объема полученных нами данных. Эти рассуждения находят подтверждение в результатах анализа насыщения мутационных замен в разных позициях кодона.

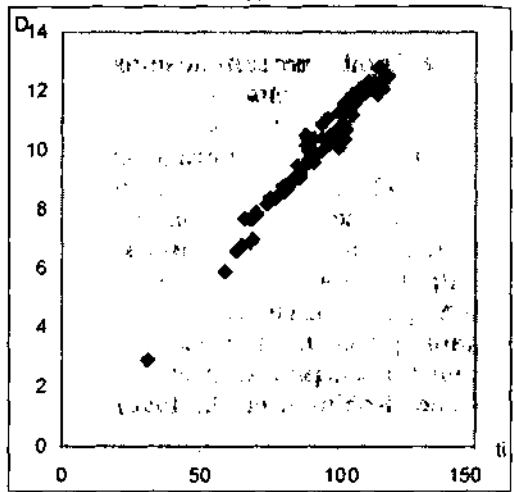
Для определения уровней насыщения транзициями и трансверсиями были построены графики зависимости между количеством мутационных замен и нескорректированными генетическими дистанциями (рис. 29). Анализ указанной зависимости выявляет отсутствие насыщения не только трансверсиями (T_v), но и транзициями (T_s) 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, поэтому для филогенетических построений были учтены все эволюционные события (т. е. оба типа замены оснований).

Для гена цитохрома *b* мтДНК T_s и T_v в третьем положении кодона близки к насыщению, уровень гомоплазии выше, чем для гена яДНК. Эта картина вполне соответствует представлениям о

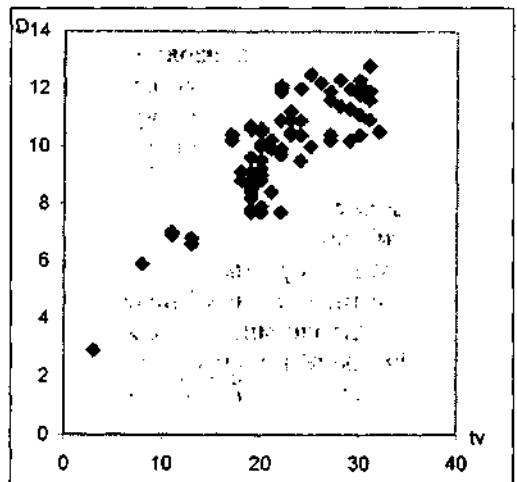
характере замен в быстро эволюционирующих последовательностях ДНК. Однако относительная насыщенность даже наиболее варибельной третьей позиции кодона транзициями, трансверсиями и гомоплазиями характерна только для внешней группы. Более того, именно в третьей позиции кодона локализовано большинство филогенетически информативных сайтов: 82,2 % (240 из 292). Поэтому филогенетические реконструкции матриархальных связей мы также проводили по данным, учитывающим все замены во всех позициях кодона.

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. mystacimís* (подрод *Karstomys*) с остальными видами *Sylvaemus*, насчитывающая примерно 7 млн лет (Michaux et al., 1997). Основываясь на этих данных, а также полученных нами оценках дивергенции *A. mystacimís* с видами подрода *Sylvaemus* (17,8 %), мы обнаружили, что молекулярная эволюция у лесных мышей шла со скоростью 2,54 % нуклеотидных замен за 1 млн лет. Это полностью соответствует оценке молекулярных часов для мтДНК млекопитающих: примерно 2,5 % дивергенции нуклеотидов за 1 млн лет (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* насчитывает более 7,5 млн лет раздельной эволюции, т. е. берет начало еще с миоцена. Эти данные уточняют палеонтологические сведения, которые датируют становление западнопалеарктического рода лесных мышей плейстоценом (Громов, 1981). Действительно, если находки современных видов рода *Sylvaemus* датируются ранним плейстоценом, начало их дивергенции должно быть раньше — в древнем плейстоцене—плиоцене. Аналогичные оценки эволюционного возраста рода *Sylvaemus* были получены нами ранее (Челомина и др., 1998a; Serizawa et al., 2000) и подтверждены в ряде других исследований (Martin et al., 2000; Michaux et al., 2002). Что касается группы видов, радирировавших от *S. sylvaticus*, они, вероятнее всего, действительно имеют плейстоценовое происхождение. Это подтверждается выво-

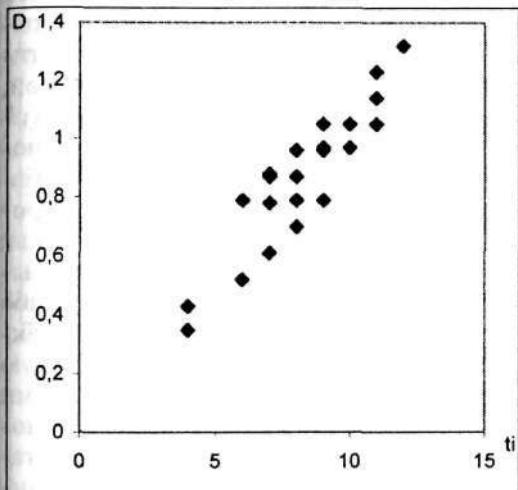
A



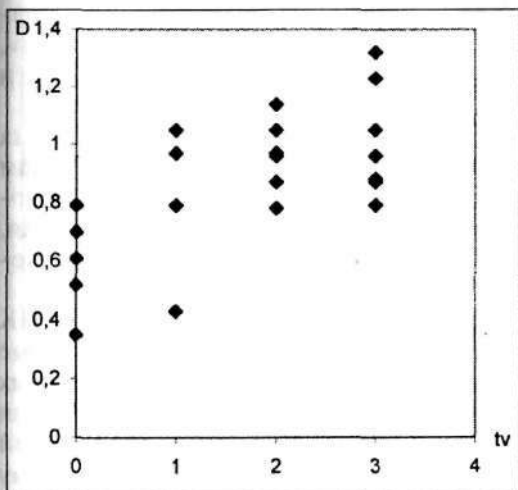
B



B



Г



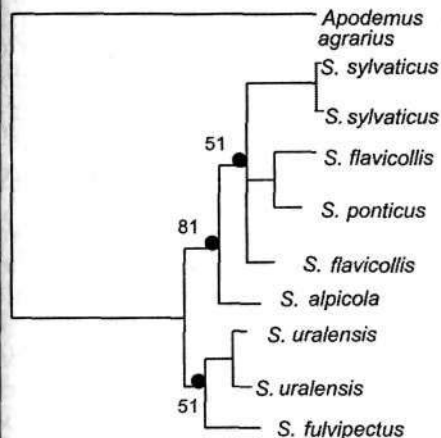
($NI=0,1124$). Однако они не дают поддержки монофилетичности лесных мышей, демонстрируя политомию, т. е. практически одновременное отделение трех эволюционных ветвей: двух монотипических с *S. fulvipectus* и *S. uralensis*, а также политипической, объединяющей четыре эволюционно более молодых вида — *S. sylvaticus*, *S. alpicola*, *S. flavicollis* и *S. ponticus* (рис. 30). Клад 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 всего клада *S. flavicollis* + *S. ponticus* не превышает 52 %-ную поддержку. Это может быть свидетельством либо парафилетичности, либо гибридогенного формообразования таксонов. Важно, что все реконструкции указывают на достоверную дифференциацию *S. fulvipectus* и *S. uralensis* с остальными видами рода, имеющими высокую бутстреп-поддержку (80–83 %) их монофилетичности. В то же время для *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 «*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 на фазе их становления, которые могут быть «стерты» в быстро эволюционирующих последовательностях мтДНК.

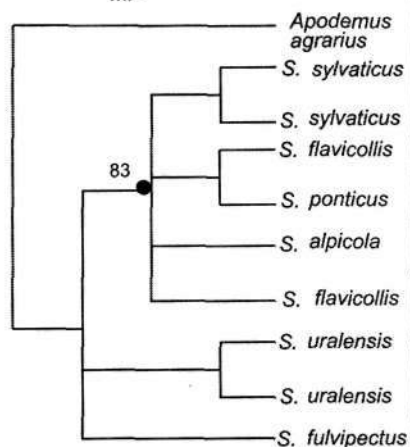
1. У многих таксонов более низкая скорость замен в яДНК минимизирует возвратные и параллельные мутации, которые снижают филогенетическое разрешение. Таким образом, в данных с низкой гомоплазией даже одиночные фиксированные отличия могут обеспечить статистически верный результат, поддержанный бутстрепом. 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 отмечают авторы (Nage, 2001), теоретически в двуполой популяции, где сам-

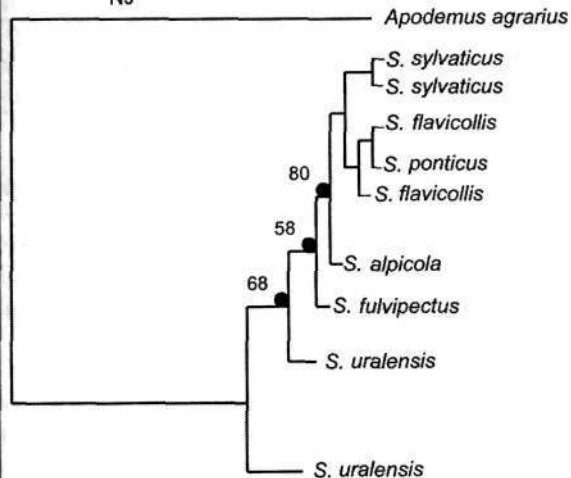
ML



MP



NJ



ки и самцы характеризуются одинаковым участием в размножении, эффективный размер аутосомных ядерных локусов в 4 раза меньше, чем митохондриальных. Следовательно, в соответствии с нейтральной моделью эволюции дивергенция в ядерных локусах по сравнению с митохондриальными должна быть в 4 раза медленнее. В этом плане наши данные имеют некоторые ограничения, более оптимальным было бы увеличение анализируемого участка по крайней мере в 4 раза.

3. Для получения правдоподобной информации о монофилии ядерных локусов по данным мтДНК было предложено правило трехкратного времени — *three-times rule*, выведенное из теоретически предполагаемого четырехразового отличия (см. выше) среднего времени монофилии ядерных и митохондриальных локусов (Naga, 2001). Согласно этому правилу длина филогенетических ветвей, соединяющих сестринские клады, является временным показателем монофилии мтДНК. Когда отношение дивергенции внутри кладов 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.

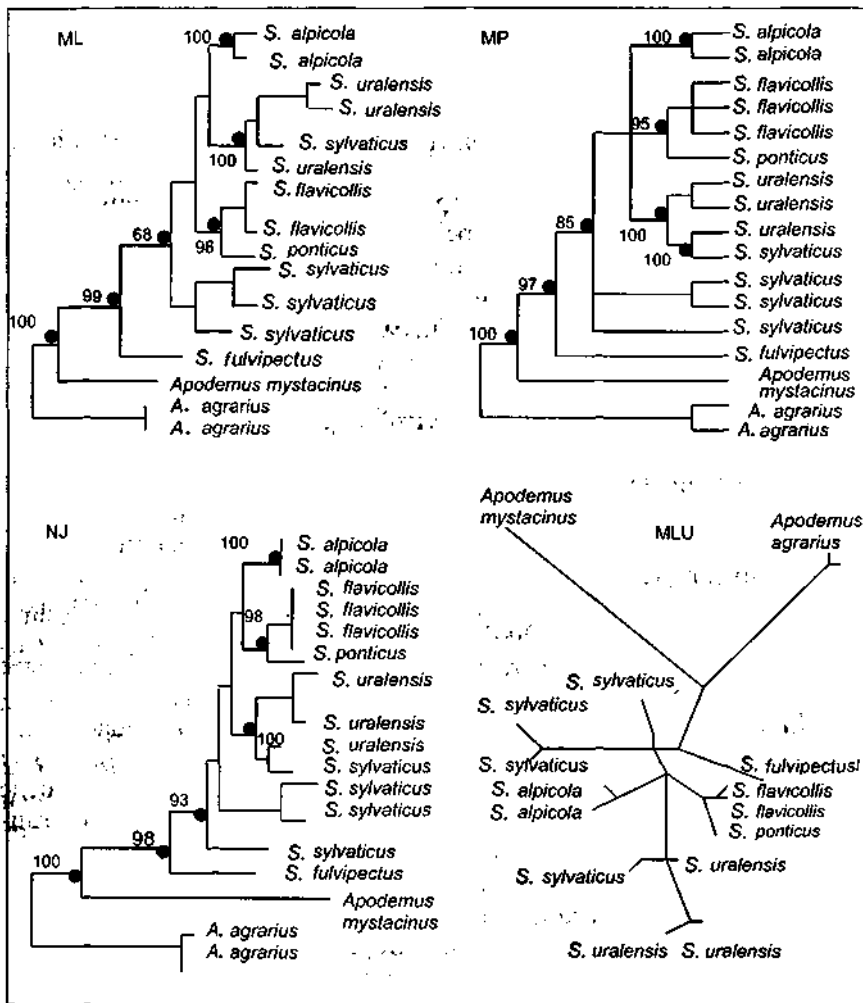
4. Полифилетичность лесных мышей, предполагаемая нашими данными, теоретически не вполне ожидаема. Популяции или виды, которые дивергировали в плейстоцене, в большинстве случаев действительно должны занимать смешанно-монофилетическую зону дивергенции, где мтДНК имеет большую возможность монофилии, но ядерный локус в среднем полифилетичен (Naga, 2001).

Эволюционный возраст западнопалеарктических мышей свидетельствует об их плиоценовом происхождении. Этого времени для приобретения монофилии большинства ядерных локусов должно быть вполне достаточно. Что же в таком случае может быть причиной «ложной» полифилии лесных мышей? Есть как минимум два объяснения: 1 — наличие в эволюционной истории событий межвидовой гибридизации и 2 — отсутствие среди анализируемых таксонов (по ядерным локусам) вида, отвечающего всем необходимым требованиям внешней группы. Действительно, если мы обратимся к филогенетическим реконструкциям по данным ПДРФ яДНК (см. гл. 1 наст. работы), где в качестве внешней

группы использованы домовая мышь и серая крыса, то увидим, что монофилия ядерных локусов лесных и полевых мышей вполне реальна. Но при этом указанные локусы не являются (в отличие от IRBP) кодирующими генами. К сожалению, мы не можем ответить сейчас однозначно, в этом ли причина расхождения результатов.

Эволюционные деревья, построенные по данным изменчивости гена цитохрома *b* мтДНК, разрешают систему связей внутри рода *Sylvaemus* иначе (рис. 31). Они имеют большую длину $L=842$ (по крайней мере отчасти оправданную увеличением числа сравниваемых таксонов с 10 по ядерным локусам до 17 по митохондриальным), 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 деревьев указывает на большую вероятность монофиличности как подрода, так и рода *Sylvaemus*. Все реконструкции обнаруживают высокую дивергенцию *A. mystacinus* с видами подрода *Sylvaemus*, что является подтверждением уже имеющихся сведений (Michaux et al., 2002).

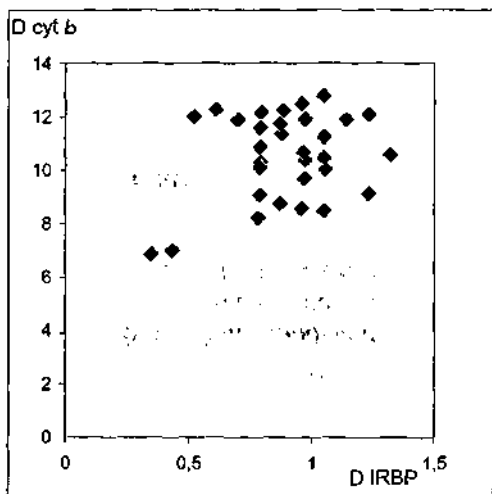
Аналогично реконструкциям для ядерного гена наиболее близкими по мтДНК являются *S. ponticus* и *S. flavicollis*, а наиболее дифференцированным видом — *S. fulvipectus*. Обращает внимание положение гаплотипов мтДНК *S. sylvaticus*: они могут представлять несколько филогенетических линий, в том числе предковую для всей группы «*sylvaticus*». Вместе с тем один из гаплотипов *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 рыжей *Clethrionomys rutilus* и красной *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). У бурого медведя гаплотипы мтДНК дивергировали между



собой значительно больше, чем один из них с гаплотипом белого медведя. 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, видообразование которых проходило примерно в тот же геологический период, что и у мышей рода *Sylvaemus* (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 выделено 5 цитотипов по характеру распределения гетерохроматинового материала и 3 цитотипа по числу ЯОР (район ядрышковых организаторов) хромосом. Другие виды данного подрода менее полиморфны по этим критериям. Для *S. uralensis* обнаружено 3 цитотипа (европейский, кавказский и азиатский) без дифференцированности по характеру распределения ЯОР. У *S. flavicollis* и *S. ponticus* выделено по 2 цитотипа, отличающихся только по ЯОР (Картавцева, 2001). К сожалению, эти данные нельзя считать полными без исследования по всему видовому ареалу каждого из перечисленных таксонов, но в любом случае наши данные филогенетических реконструкций матриархальных связей указывают на высокую изменчивость и предполагают полифилетичность *S. sylvaticus*. В отличие от данного вида все остальные представители подрода имеют высокие (95–100 %) бутстреп-значения монофилетичности. Тем не менее маловероятно (54–62 %), что эта группа (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 молекулярные эволюции гена IRBP яДНК и гена цитохрома Ъ мтДНК имеют низкие корреляции (рис. 32). Некоторое несоответствие молекулярных филогении лесных мышей по данным ядерного и митохондриального маркеров продемонстрировано ранее при сравнении данных ПДРФ суммарной яДНК и измен-



[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 возникла сначала группа одних видов, каждый из которых затем в результате последовательной дивергенции дал начало новым видам.

Как мы уже отмечали, ни в одной из известных 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 различаются между собой, 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 в смысле видового, но и внутривидового разнообразия. Например, полифилия *S. sylvaticus* может быть подтверждена, а недавняя интрогрессия между *S. sylvaticus* и *S. uralensis* — отвергнута, если идентичные гаплотипы будут обнаружены в отдаленных локалитетах 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, так как до сих пор отсутствуют одномасштабный генетический анализ и детальное изучение лесных мышей по всему ареалу. И прежде всего это справедливо в отношении видов рода *Sylvaemus*.

Сложилось так, 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 эволюционных событиях таксонов, имеющих ранг «хороших» самостоятельных видов. Во-вторых, ядерные и митохондриальные филогении по определению имеют право на отличия и даже на собственную эволюционную историю (так как прежде всего имеют разные типы наследования). Поэтому есть основания сомневаться в целесообразности их объединения в единую филогенетическую концепцию (т. е. консенсусное древо). 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 дисперсию. 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 опирались на филогению гена яДНК и детализировали ее данными по митохондриальному геному.

Палеарктика открывает особые возможности для молекулярно-генетических и филогеографических исследований. Однако палеонтологические данные по палеарктическим представителям семейства мышей (в отличие, например, от 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—плиоценом. Этот период характеризуется существенными климатическими переломами, которые привели к радикальным изменениям растительности на всей планете (цит. по: Michaux et al., 2002). Согласно Т. Церлингу с коллегами (Cerling et al., 1997), Европа (по сравнению с Азией, где происходили наиболее драматические со-

бытия) была более защищена от климатических изменений и (поэтому) оставалась покрытой лесами, играющими важную роль в видообразовании и эволюции лесных мышей. Считается, что предок *A. mystacinus* (*A. primaevus*) присутствовал в Европе с миоцена, но истинная *A. mystacinus* появилась только в среднем плиоцене. За этот период виды широко распространились, но имели низкую плотность 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 *A. mystacinus* и *A. epimelas* (Borisova, 1993; Michaux et al., 2002).

Радиация видов подрода *Sylvaemus* имела место на границе миоцена и плиоцена. В этот период в Палеарктике климат вначале флуктуировал между субтропическим с теплой и сырой погодой и холодным сухим. Затем, примерно 3,1 млн лет назад произошло первое ледниковое похолодание 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 3 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 видových ареалов и некоторых сведений из области генетики, скорее всего, это была Центральная и/или Малая Азия. Именно на такую возможность впервые указал Н.Н. Воронцов с соавторами (Воронцов и др., 1989; 1992). Позже их мнение разделили и другие авторы (Musser et al., 1996; Serizawa et al., 2000).

Мы полагаем, что 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 в Юго-Восточной Азии. Колонизация Западной Европы предками *S. sylvaticus* (которые, вероятно, не могли успешно конкурировать с более крупной горной малоазийской мышью *A. mystacinus* и другими видами мелких млекопитающих либо плохо переносили климатические особенности) проходила по самому южному пути, через север Аравийского полуострова и Африки. Это вполне ре-

ально, так как в первой половине плиоцена фаунистический облик Юго-Восточной Азии, Индии и Африки был практически идентичным. На территории Северной Африки лесные мыши обитают до сих пор. Предок современной *S. flavicollis* успешно (но, видимо, относительно медленно из-за преодоления естественных географических преград) миновал 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, давшей в современности 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 общего для них предка). Мы допускаем возможность такого эволюционного сценария, но нам представляется более правдоподобным увязывание происхождения альпийской мыши с *S. flavicollis* (аналогично ситуации с *S. ponticus* на Кавказе). Такой вариант подкрепляется признанием самих авторов цитированной работы фактом 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).

Существует и другая филогенетическая концепция для западнопалеарктических лесных мышей (Michaux et al., 2002), согласно которой в плиоцене Западная Европа была заселена предковой для лесных мышей формой, которая со временем (минув периоды резкого спада и подъема численности) распалась на ряд форм, известных в настоящее время как виды рода *Sylvaemus*.

ВНУТРИВИДОВАЯ ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ И ФИЛОГЕОГРАФИЯ

Самые сложные и самые запутанные группы наиболее привлекательны, так как они самым непосредственным образом ведут в проблематику видо- и расообразования.

Б. Ренш

Следующее после классификации видов приложение филогенетического анализа заключается в идентификации подвидов — природных филогеографических подразделений ниже видового уровня. Подвидовое обозначение для дифференцированных, географически изолированных популяций всегда было одним из дискуссионных предметов в биологических науках. Как пишет С. О'Брайен (O'Brien et al., 1996), Ч. Дарвин называл их расами или зарождающимися видами. Ф. Добржанский считал подвидами некоторые популяции, существенно отличающиеся, чтобы заслуживать латинское имя. Э. Майр определял подвиды как совокупность локальных популяций вида, населяющих географически подразделенные области вида и отличающиеся таксономически от других популяций вида. Относительно недавно Дж. Эвайс и С. Бол в попытке найти объективный критерий для распознавания подвидов предложили новое обозначение для подвидовых популяций как проявляющих согласующиеся разграничения по некоторому множеству независимых признаков генетической природы. Затем С. О'Брайн и Э. Майр объединили подвидовые классификации, чтобы включить индивидуальные популяции, которые разделяют уникальные географические области или места обитания, группы филогенетически согласующихся фенотипических признаков и уникальную естественную историю относительно других подразделений видов.

Принципы популяционного анализа, впервые появившиеся в начале XVIII в. в работах Т. Мальтуса, окончательно сформирова-

лись в начале XX в. Основы генетики популяций были заложены английским математиком Х. Харди и немецким врачом В. Вайнбергом, применившими математический анализ при изучении больших совокупностей организмов — популяций. Тем самым было положено начало изучению законов «микроэволюции», в отличие от оперирующей более высокими таксономическими категориями «макроэволюции» (цит. по: Инге-Вечтомов, 1996). Позже Р. Фишер, Дж. Холдейн и С. Райт разработали теорию генных частот и их динамики под действием эволюционных факторов. Большой вклад в развитие анализа популяций как самостоятельной структурной единицы вида внесли представители отечественной школы генетиков: С. Четвериков обратил внимание на значение колебаний численности популяций и возникновение между ними изолирующих барьеров как на важные факторы эволюции, объяснил, что свободное скрещивание в популяциях (панмиксия) служит механизмом стабилизации в ней частот генотипических классов гомозигот и гетерозигот; С. Серебровский с сотрудниками впервые исследовали геногеографию и «генофонд» сельскохозяйственных животных, причем сам термин был предложен ими для обозначения всей полноты генетических потенций популяций, как естественных, так и искусственных; Ю. Филипченко с учениками изучали наследование и изменчивость количественных признаков, ими предложены термины «макро- и микроэволюции» для обозначения эволюционных процессов, протекающих на внутривидовом и надвидовом уровнях (цит. по: Кайданов, 1996). Возможность эффективного проведения генетических исследований на низких таксономических уровнях до недавнего времени была ограничена из-за отсутствия соответствующих молекулярных маркеров. Ситуация изменилась в последние десятилетия, когда были разработаны новые высокотехнологичные молекулярные методы. Среди наиболее часто используемых оказались молекулярные маркеры мтДНК.

Степень дивергенции нуклеотидных последовательностей митохондриального генома между различными географическими популяциями прямо пропорциональна увеличению возраста и полноты их изоляции, причем возможность генного обмена между географическими популяциями у представителей различных классов позвоночных не одинакова. Существенную роль здесь играет способ передвижения. Популяции, не имеющие географиче-

ческого и репродуктивного барьера, имеют более низкие генетические дистанции. Таким образом, внутривидовая изменчивость определяется историей вида и структурой его ареала. В зависимости от внутренней структуры все виды можно объединить в пять категорий (Avise et al., 1987): 1 — виды, включающие популяции с долговременным географическим или/и генетическим барьером; 2 — виды, популяции которых дивергировали позже, а географический барьер может отсутствовать; обмен генами между популяциями внутри видов категории 1 и 2 прекращен; 3, 4 и 5 — виды, у которых между популяциями сохранился соответственно слабый, средний и сильный поток генов. Уровень внутривидовой дивергенции мтДНК будет уменьшаться постепенно в вышеуказанной последовательности.

Кроме вышеперечисленных факторов степень полиморфизма мтДНК внутри популяции зависит от общего размера популяции, количества клеточных делений на организменную генерацию, соотношения полов (Clark, 1985). Высокая внутривидовая гомология митохондриального генома может быть следствием быстрого расселения исходно небольшого количества особей (вплоть до одной самки-основательницы) при освоении новых ареалов, а также свидетельством эволюционной молодости популяции. В популяционно-генетических исследованиях анализ структурных особенностей мтДНК может выявить маркерную для популяции последовательность нуклеотидов (например, при уточнении предкового генотипа популяции, идентификации видов-двойников), определить интенсивность и направление скрещиваний в гибридных зонах.

3.1. Пространственно-временная генеалогия мтДНК восточноазиатской лесной мыши *Apodemus peninsulae*

Смолкает ум философа неловкий...
Он говорит при виде этих стен:
«Ничем не объяснимый феномен»

И.В. Гете

Фауна мелких млекопитающих северо-восточной Азии, ареал которых включает множество географически разделенных доме-

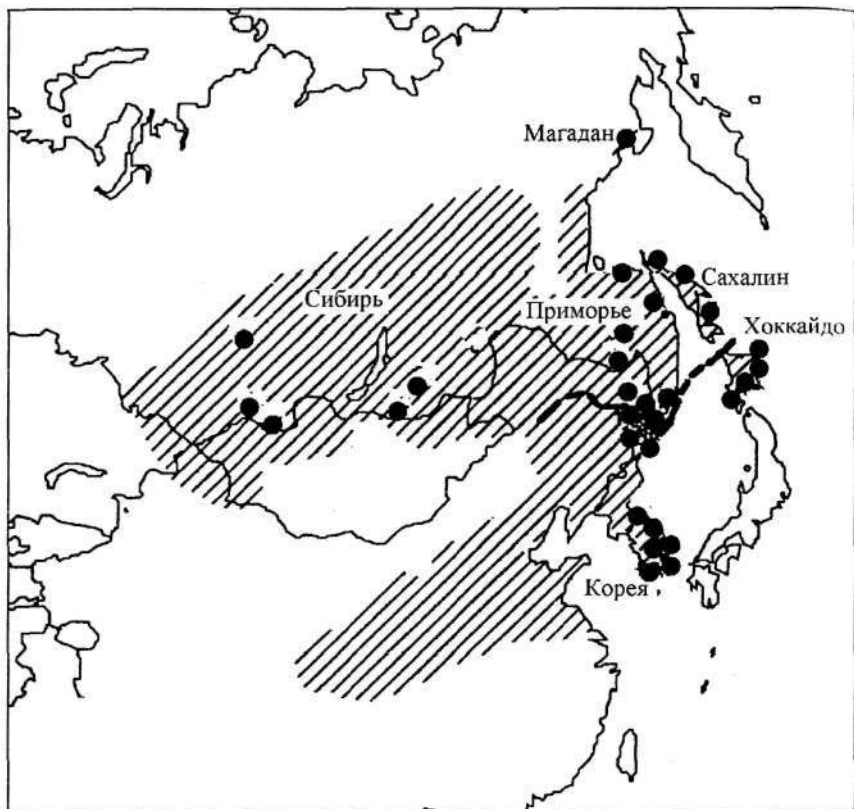
нов, представляет несомненный интерес для эволюционной биологии, историко-фаунистических реконструкций и понимания направленности генетической дифференциации. Восточноазиатская (корейская) лесная мышь *Apodemus peninsulae* широко распространена в Азии (см. рис. 1). Она населяет наиболее северные пространства азиатской части ареала *Apodemus*: юг Сибири, Приморье, Корейский полуостров, острова Сахалин и Хоккайдо (Павлинов и др., 1995), на континенте встречаясь с *A. agrarius*, а на Хоккайдо — с *A. speciosus* и *A. argenteus*. Лишь на о-ве Сахалин и в самых северных местах материка (Якутия, Магаданская область) восточноазиатская лесная мышь является единственным представителем «*Apodemus*». Если северные границы ее ареала вдоль побережья Охотского моря достигают Магаданской области, то южные — Тибета. Восточными границами являются острова Сахалин и Хоккайдо, западными — Восточная Сибирь и Алтай (Громов, 1995; Костенко, 2000). Морфологическая дифференциация восточноазиатской лесной мыши выражена слабо. В мировых сводках описано 9 подвидов: *A. p. peninsulae*, *A. p. nigritahis*, *A. p. giliacus*, *A. p. praetor*, *A. p. sowerbyi*, *A. p. qinghaiensis*, *A. p. rufuhis*, *A. p. majusculus*, *A. p. major* (Corbet, 1978; Musser, Carleton, 1993), наиболее реальные из которых первые 6 (Воронцов и др., 1977). В фауне млекопитающих России выделяют три подвида: *A. p. peninsulae*, *A. p. major* и *A. p. giliacus* (Павлинов и др., 1995).

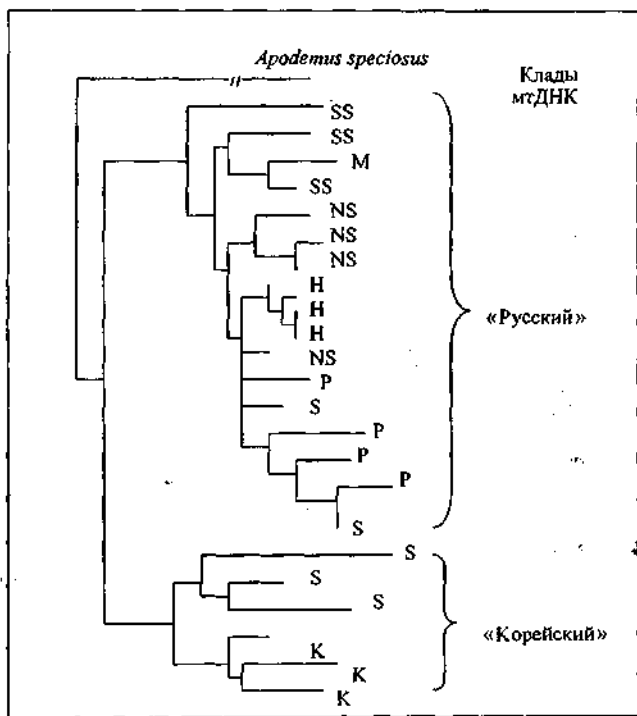
Приуроченность экологического оптимума восточноазиатской лесной мыши к хвойно-широколиственным, широколиственным и долинным лесам позволяет считать его неморальным фаунистическим элементом восточноазиатского генезиса. Хотя неарктические связи у него не прослеживаются, наблюдается тесная, на уровне эндемичных видов, связь с фауной Японии и Северо-Восточного Китая (Костенко, 1997). Вид широко известен в связи с хромосомной изменчивостью полиморфных В хромосом. В этом плане он уникален, так как имеет самые высокие числа В хромосом и наибольшее их разнообразие по размерно-морфологическим характеристикам. Несмотря на высокую популяционную, индивидуальную, тканевую изменчивость, каждая популяция по В-хромосомным типам и числам имеет некоторую общую ориентацию. Не обнаружены В хромосомы лишь у индивидуумов Сахалина (Бекасова и др., 1980; Борисов, 1990а-г; Картавцева и др., 1990; Борисов, Малыгин, 1991).

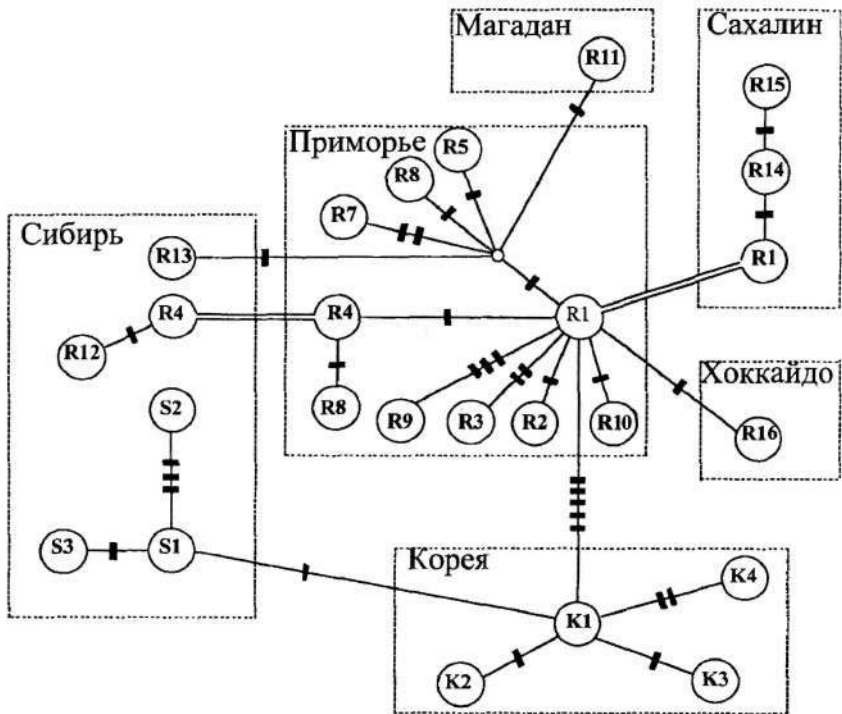
Результаты собственных исследований (Челомина, 1993а,б; 1996; Челомина и др., 1998а,б), а также данные других авторов (Suzuki et al., 1990; Serizawa et al., 2000) указывают на продолжительную, до 10 (!) млн лет, эволюционную историю вида. Тем не юнее помимо отсутствия ясно выраженной морфологической и ариологической подвидовой дифференциации, у *A. peninsulae* райне низок белковый полиморфизм: $D=0,001-0,02$ между популяциями, относящимися к разным морфологическим подвидам, что соответствует минимальным значениям межпопуляционных отличий в различных подвидах грызунов (Павленко, 1997). Поэтому далее внутривидовая дифференциация была проверена нами на уровне быстро эволюционирующей последовательности участка гена цитохрома *b* мтДНК (Serizawa et al., 2002). Животные (были отловлены из 23 локальных популяций, объединенных в 5 доменов (рис. 33).

Результаты показали, что *A. peninsulae* имеет два клада мтДНК с центрами их географической локализации на Корейском полуострове и в Приморском крае российского Дальнего Востока (рис. 34—35.). Генетические дистанции между гаплотипами мтДНК составили всего 0,0025—0,0310, что предполагает 1000—15 000-летний, т. е. голоценовый, период внутривидовой дифференциации восточноазиатской лесной мыши исследуемой части ареала. Таким образом, полученные данные подтвердили выводы более ранних исследований белкового полиморфизма этого вида (Павленко, 1989) относительно недавней экспансии, связанной с глобальными климатическими изменениями. В этот же период времени резкое сокращение численности пережили многие другие виды дальневосточной фауны, в том числе амурский тигр и дальневосточный леопард.

Являются ли Приморье и Корея, как это можно предположить, основываясь на филогенетических реконструкциях, центрами генетического разнообразия *A. peninsulae*? Чтобы ответить на данный вопрос, мы вначале устранили влияние неоднозначности выборок из различных географических доменов, для чего была вычислена их генетическая гетерогенность — *H* (табл. 9). Из проведенных сопоставлений становится очевидным, что в настоящее время основным центром генетического разнообразия восточноазиатской лесной мыши среди сравниваемых доменов является Приморье, экологические условия которого на данном историче-







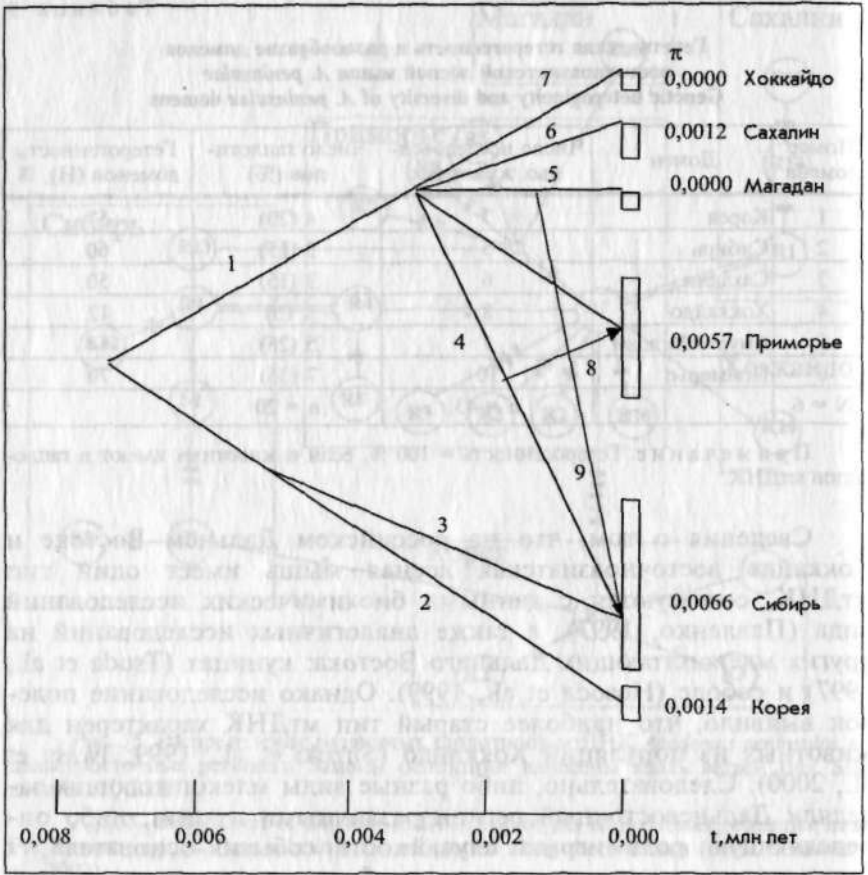
**Генетическая гетерогенность и разнообразие доменов
восточноазиатской лесной мыши *A. peninsulae*
Genetic heterogeneity and diversity of *A. peninsulae* domens**

| Номер домена | Домен | Число исследованных животных | Число гаплотипов (%) | Гетерогенность доменов (H), % |
|--------------|--------------|------------------------------|----------------------|-------------------------------|
| 1 | Корея | 7 | 4(20) | 57 |
| 2 | Сибирь | 5 | 3(15) | 60 |
| 3 | Сахалин | 6 | 3(15) | 50 |
| 4 | Хоккайдо | 8 | 1(5) | 12 |
| 5 | Амур+Магадан | 7 | 5(25) | 64 |
| 6 | Приморье | 10 | 7(35) | 70 |
| N = 6 | | n = 43 | n = 20 | |

Примечание. Гетерогенность = 100 %, если n животных имеют n гаплотипов мтДНК.

Сведения о том, что на российском Дальнем Востоке и Хоккайдо восточноазиатская лесная мышь имеет один тип мтДНК, согласуются с данными биохимических исследований вида (Павленко, 1997), а также аналогичных исследований на других млекопитающих Дальнего Востока: куницах (Tsuda et al., 1997) и соболе (Nosoda et al., 1999). Однако исследование полевых выявило, что наиболее старый тип мтДНК характерен для животных из популяций Хоккайдо (Suzuki et al., 1999; Iwasa et al., 2000). Следовательно, либо разные виды млекопитающих заселяли Дальневосточный регион различными путями, либо определяющую роль играла случайность события-основателя, а также различная конкурентная способность симпатрических видов (Serizawa et al., 2002).

Существование двух кладов мтДНК для популяций Корейского полуострова и Приморья соответствует палеогеографическим данным по восточной Азии (Tsukada, 1985; Nazarenko, 1990). Указанные территории могут рассматриваться как послеледниковые рефугиумы, являющиеся резервуаром генетического разнообразия *A. peninsulae*, из которого в период голоценового оптимума эта мышь широко распространилась по Дальнему Востоку и Сибири. Очевидно, это происходило так, как представлено на рис. 36 (Serizawa et al., 2002).



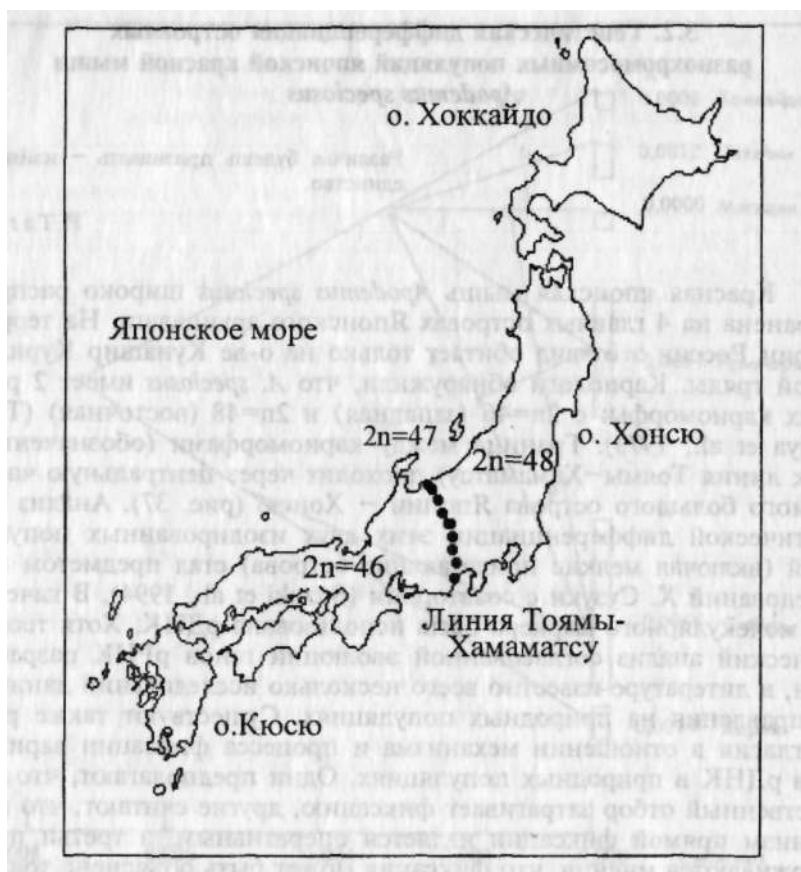
3.2. Генетическая дифференциация островных разнохромосомных популяций японской красной мыши *Apodemus speciosus*

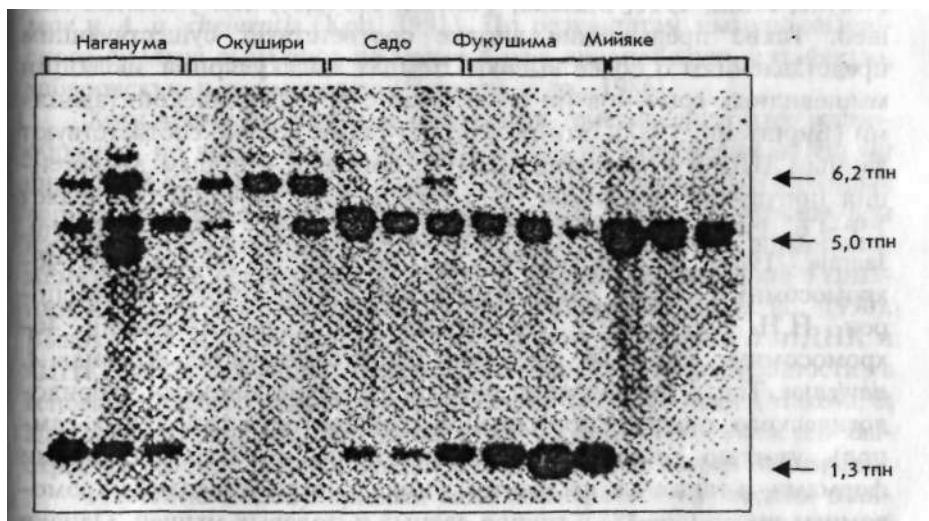
Различья будешь признавать — найдешь
единство.

Р. Тагор

Красная японская мышь *Apodemus speciosus* широко распространена на 4 главных островах Японского архипелага. На территории России этот вид обитает только на о-ве Кунашир Курильской гряды. Кариологи обнаружили, что *A. speciosus* имеет 2 разных кариоморфы: с $2n=46$ (западная) и $2n=48$ (восточная) (Tsuchiya et al., 1973). Граница между кариоморфами (обозначенная как линия Тоямы—Хамаматсу) проходит через центральную часть самого большого острова Японии — Хонсю (рис. 37). Анализ генетической дифференциации этих двух изолированных популяций (включая мелкие прилегающие острова) стал предметом исследований Х. Сузуки с соавторами (Suzuki et al., 1994). В качестве молекулярного маркера была использована рДНК. Хотя теоретический анализ согласованной эволюции генов рРНК разработан, в литературе известно всего несколько исследований данного направления на природных популяциях. Существуют также разногласия в отношении механизма и процесса фиксации вариантов рДНК в природных популяциях. Одни предполагают, что естественный отбор затрагивает фиксацию, другие считают, что механизм прямой фиксации является оперативным, а третьи придерживаются мнения, что фиксация может быть объяснена только как результат случайного дрейфа (цит. по: Suzuki et al., 1994). Так или иначе, но степень разнообразия генов рРНК тем выше, чем многочисленнее популяция (Suzuki et al., 1994). Еще одно интересное свойство рДНК эукариот заключается в том, что между типом структуры рДНК и фенотипическими свойствами организма существует корреляция, и это открывает новые перспективы применения данного молекулярного маркера, в частности для решения задач прикладной генетики (Cluster et al., 1987).

Авторами (Suzuki et al., 1994) была собрана коллекция из 129 индивидуумов, принадлежащих 35 локальным популяциям. Для популяционного анализа использовали полиморфные сайты,





Внутривидовую генетическую дифференциацию *A. speciosus* изучали также с помощью гена цитохрома *b* мтДНК (Челомина и др., 1998а). Данные секвенирования 402 пн участка позволили установить, что последовательности мтДНК 48-хромосомной кариоморфы дивергировали на 0,25—3,73 %. Принимая скорость эволюции мтДНК равной 2,5 % замен оснований за 1 млн лет (Irwin et al., 1991; Meyer et al., 1990), мы получили временной интервал дифференциации островных популяций *A. speciosus* от 100 тыс. до 1,5 млн лет. Раньше всех отделилась популяция о-ва Аомори, затем популяция о-ва Кунашир и только после этого дифференцировались мыши Хоккайдо и двух прилежащих к нему мелких островов: Ричира и Окушира. Внутривидовые значения генетических дистанций хищников по данным частичного секвенирования гена цитохрома *b* мтДНК ниже (0,3—1,3 % — для койота, 0,3—0,5 % — для серого волка и примерно 0,8 % — для куницы (Wayne, Jenks, 1991; Masuda, Yoshida, 1994a,b), чем у лесных мышей. Такое превышение вполне соответствует существующим представлениям о более высоких темпах молекулярной эволюции мышевидных грызунов по сравнению с другими млекопитающими (Бирштейн, 1987). Эти результаты также вполне соответствуют данным ПДРФ суммарной мтДНК, согласно которым дивергенция популяций *A. agrarius*, *S. sylvaticus* и *S. flavicollis* составляет 1,9—4,6, 1,4 и 1,0 % соответственно (Koh, Yoo, 1992; Tegelstrom, Jaarala, 1989). К сожалению, мы не смогли исследовать 46-хромосомную форму, таксономический статус которой неоспорен. Н.Н. Воронцов с соавторами (1977) рассматривали 46-хромосомную форму *A. speciosus* в ранге самостоятельного вида *A. navigator*. Такая точка зрения была поддержана данными гибридологического анализа (пониженной плодовитости гибридных самцов), узостью гибридной зоны между 46 и 48-хромосомными формами, а также самим фактом уникальности изменения хромосомных чисел (46—48) в группе лесных и полевых мышей. Однако результаты последующих генетических исследований (аллозимных и на уровне ДНК) не дали убедительных доказательств видовой самостоятельности *A. navigator*. Поэтому большинство исследователей рассматривают эту мышь как хромосомную расу *A. speciosus* (Saitoh et al., 1989).

3.3. Генетические взаимоотношения между двумя подвидами полевой мыши *Apodemus agrarius* Корейского полуострова

Целое находится в своих частях в любой части через любую часть.

Н. Кузанский

Ареал *A. agrarius* обширен. Эта мышь населяет территорию от падных границ Германии до берегов Тихого океана с дизъюнкцией ареала в районе оз. Байкал (см. рис. 2). На территории бывшего Советского Союза описано 9 форм, хотя признается не более 4 подвидов: *A. a. agrarius*, *A. a. karelicus*, *A. a. tianschanicus* и *A. a. mantchuricus* (Громов, 1995). На территории азиатского континента выделяют 8 подвидов: *A. a. agrarius*, *A. a. mantchuricus*, *A. a. ningpoensis*, *A. a. pallidior*, *A. a. chevrieri*, *A. a. insulaemus*, *A. a. coeae* и *A. a. chejuensis* (Koh, 1991). По результатам иммунологического анализа выделяют не менее 4 рас: европейскую, алтайскую, хабаровскую и приморскую (Чернуха и др., 1986).

Хотя восточноазиатские популяции генетически более разнообразны, по всему ареалу полевой мыши не зарегистрировано ни фиксации альтернативных аллелей, ни смены основных белковых вариантов (Павленко, 1997). Аналогичные данные получены при изучении полиморфизма яДНК и мтДНК. Изменения в расположении сайтов рестрикции в рДНК *A. agrarius* из Западной Германии и Кореи тоже оказались минимальными (Suzuki et al., 1990). Высокое сходство обнаружили участки гена цитохрома *b* мтДНК и яДНК, фланкирующие микросателлитные последовательности в геномах полевых мышей из Челябинска и Чернобыля (Makova et al., 2000). Очевидно, причиной этих особенностей является быстрое расселение полевой мыши в период голоценового оптимума.

Изучение молекулярными методами филогенетических взаимоотношений различных морфотипов и анализ внутривидовой таксономии *A. agrarius* на протяжении ряда лет проводится корейскими генетиками (Koh, 1986, 1987, 1991; Koh, Yoo, 1992; Koh et al., 1993; Koh et al., 2000). В частности, с помощью метода анализа ПДРФ мтДНК они доказали, что *A. a. paillescens* является синонимом *A. a. coeae*, а два подвида — *A. a. chejuensis* и *A. a. coeae* —

имеют четкие отличия (Коп, 1986, 1987, 1991; Koh, Yoo, 1992). В ходе анализа у одной особи о-ва Ченджу авторы обнаружили уникальный гаплотип мтДНК, дивергировавший с остальными клонами на 4,6 %, что соответствует 2,3 млн лет со времени его дифференциации, если последовательности мтДНК дивергировали со скоростью 2 % за 1 млн лет (Brown et al., 1979). Для более достоверной интерпретации своей находки авторы планируют расширить исследования. Сравнение остальных гаплотипов мтДНК *A. agrarius* Кореи показало, что уровень дифференциации материковых и островных популяций колеблется от 0,2 до 3,3 %. Следовательно, изоляция островов проходила в период от 1,6 млн лет до 10 тыс. лет. Уровни генетических различий между популяциями полевой мыши находятся в пределах значений внутривидовой дифференциации (определенных этим же методом, т. е. по ПДРФ мтДНК) не только других видов лесных мышей, но и представителей других родов и семейств отряда грызунов. Например, внутривидовая дифференциация европейских лесных мышей *Sylvemus sylvaticus* составляет 1,4 %, *S. flavicollis* — 1,0 % (Tegelstrom, Jaarala, 1989), серой крысы *Rattus norvegicus* — 0,2–0,8 % (Brown, Simpson, 1982), рыжей полевки *Clethrionomys rutilus* — 0,89 % (Tegelstrom et al., 1988), а североамериканского грызуна *Peromyscus maniculatus* — 7,0 % (Lansman, 1983).

По мнению зоологов (Corbet, 1978), *A. a. chejuensis* корейского о-ва Чеджу довольно крупный подвид. Морфометрический анализ хорошо дифференцирует *A. a. chejuensis* от *A. a. cogeeae* Корейского полуострова (Koh, 1986). Результаты анализа ПДРФ мтДНК дали основание считать *A. a. chejuensis* самостоятельным видом — *A. a. chejuensis* Jones and Johnson (Koh, Yoo, 1992). Популяция этого таксона с о-ва Ван, напротив, характеризовалась мелкими размерами особей. Но их дивергенция с другими популяциями *A. a. chejuensis* составила 3,3 %, что, по мнению авторов, могло быть поводом для пересмотра таксономического статуса (Koh, Yoo, 1992).

Исследование внутривидовой изменчивости *A. agrarius* Корейского полуострова с помощью секвенирования 282 пн участка наиболее быстро эволюционирующего контрольного региона мтДНК дополнило уже имеющиеся сведения и прояснило окончательно ситуацию с *A. a. chejuensis* и *A. a. cogeeae* (Koh et al., 2000). У 70 исследованных полевых мышей было обнаружено 44 уни-

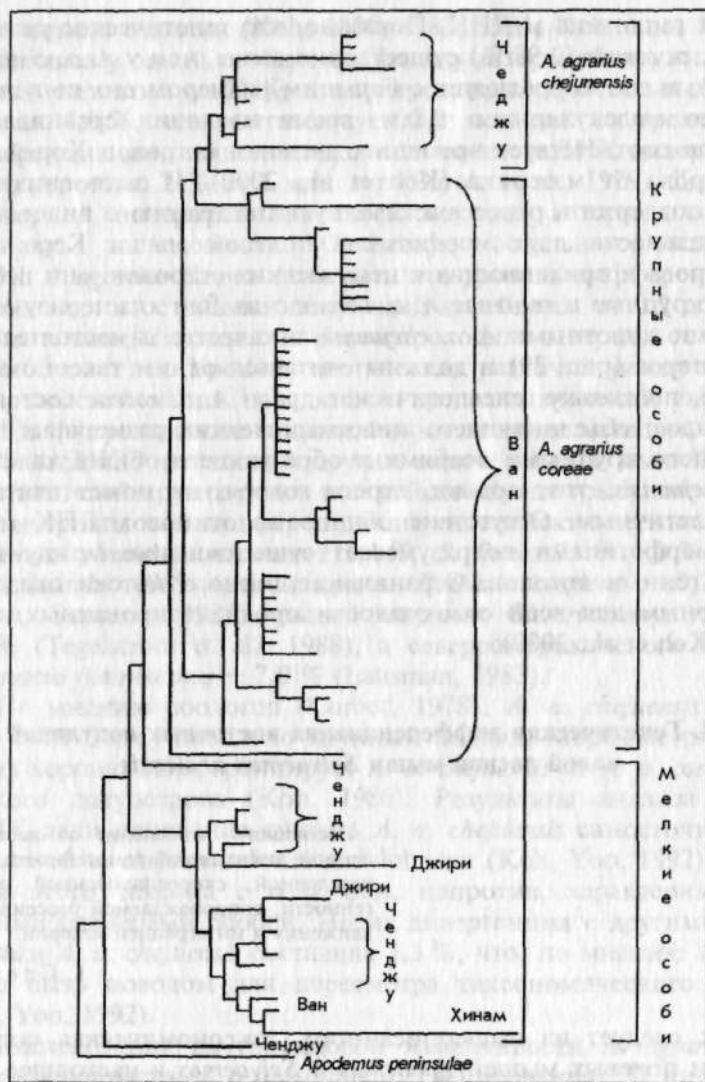
кальных гаплотипа мтДНК. Показано, что генетическое разнообразие *A. a. sogae* (2,98 %) существенно выше, чем у *A. a. chejuensis* (1,86 %), и это коррелирует с большим размером его популяции. Согласно молекулярным часам, время изоляции сравниваемых подвидов соответствует времени отделения островов Корейского полуострова от материка (Koh et al., 2000). И хотя авторы не смогли поддержать ранее высказанную концепцию о видовой самостоятельности двух морфотипов полевой мыши Корейского полуострова и прилегающих к нему мелких островов, они показали, что крупные животные *A. a. sogae* о-ва Ван кластеризуются с крупными животными *A. a. chejuensis* в качестве самостоятельных подкластеров (рис. 39) и должны считаться одним таксоном. Более того, поскольку генеалогическое древо *A. a. sogae* состоит из двух кладов: объединяющего животных мелких размеров и представленного крупными особями и образующего общий кластер с *A. a. chejuensis*, этот подвид, строго говоря, не может считаться монофилетичным. Отсутствие общих гаплотипов мтДНК между двумя морфотипами подразумевает существование между ними низких генных потоков. Ограничение генного потока оказалось характерным для всей совокупности проанализированных популяций (Koh et al., 2000).

3.4. Генетическая дифференциация восточных популяций малой лесной мыши *Sylvaemus uralensis*

...Эволюция - изменение от неопределенной, несвязанной гомогенности к определенной, скоррелированной гетерогенности, сопровождаемой рассеиванием движения и интеграцией материи.

Г. Спенсер

Как следует из вышеописанного, таксономическая система лесных и полевых мышей *Apodemus* и *Sylvaemus* в настоящее время интенсивно разрабатывается. Однако несмотря на значительные успехи, по-прежнему остро ощущается недостаток фактического материала, соответствующего уровню современных таксономических исследований для многих конкретных форм, и в том



числе — для вида *Sylvaemus uralensis* Pallas, 1811. Малая лесная (уральская) мышь *Sylvaemus uralensis* распространена от Восточной Европы и Турции на западе до Алтая и Северо-Восточного Китая на востоке, а на юге — до Иранского нагорья (граница очно не установлена) (см. рис. 1). Для этого вида известно не менее 13 подвидовых форм (Павлинов, 1995; Musser, Carleton, 1993), а некоторые авторы выделяют из ее состава самостоятельные таксоны в ранге видов (Орлов и др., 1996). Генетическая дискретность малой лесной мыши *S. uralensis* (ранее рассматриваемой в составе *S. sylvaticus*) и ее конспецифичность по обширному ареалу от Центральной Европы на западе до юго-западного Зауралья на востоке были подтверждены по ряду морфологических отличий, результатам исследования белкового полиморфизма и экспериментам по гибридизации (Csaikl et al., 1980; Gemmeke, 1983; Filippucci, 1992). Хотя сам факт существования как генетической, так и морфологической дифференциации малой лесной мыши сомнений не вызывает, генетическая диагностика выявила ряд систематических проблем, требующих привлечения современных методов исследования (Орлов и др., 1996; Orlov et al., 1996; Богданов, 2000).

Нашей целью было выяснение филогенетических связей дискретных хромосомных форм *S. uralensis*, заселяющих обширные территории восточных частей ареала и четко различающихся по содержанию С-окрашиваемого гетерохроматина, а также локализации ЯОР (Челомина и др., 2000). Для ее достижения мы пытались установить, сопровождается ли кариотипическая эволюция дивергенцией нуклеотидных последовательностей ДНК и в какой мере соответствуют друг другу хромосомные и молекулярные отличия. Хотя точно границы ареалов данных популяций еще не определены, установлено, что восточноевропейская форма заселяет Центральный и Центрально-Черноземный регионы России, Среднее Поволжье, Южный Урал, междуречье Волги и Урала; азиатская форма — области восточного Казахстана, Узбекистан, Туркмению, а также Непал. Предполагается, что в образовании двух данных форм основную роль сыграла непродолжительная географическая изоляция исходно широко распространенных популяционных комплексов (Богданов, 2000, 2001).

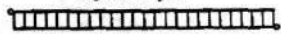
Использовали метод RAPD-PCR анализа. Полимеразная цепная реакция (PCR), позволяющая умножить небольшой уча-

сток генома, была изобретена К. Мюллисом (Mullis) в 1983 г., за что через 10 лет он был награжден Нобелевской премией. Широко известность и применение метод получил после открытия термостабильной (Taq) ДНК-полимеразы (Saiki et al., 1988). PCR позволяет амплифицировать одиночные локусы ДНК в миллионы раз и получать последовательность длиной в несколько сотен пар оснований. Существуют различные модификации метода, один из наиболее часто используемых — RAPD-анализ случайно амплифицированной полиморфной ДНК, как правило, некодирующей (Williams et al., 1990). Большинство полимераз распознают однонитиевую ДНК как подходящую матрицу и связываются с ней в точке, соседствующей с двуцепочечной нитью. ДНК-полимераза однонаправлена: новая ДНК синтезируется по направлению от 5'- к 3'-концу (рис. 40). В идеальных условиях Taq-полимераза может синтезировать тысячи пар оснований в минуту. Обычно 30 с достаточно для синтеза продуктов с молекулярной массой до 500 пн, 60 с — для 500—1500 пн и 90 с — для более высокомолекулярных ампликонов (хотя в этом случае повышается возможность появления артефактов). В каждом конкретном случае необходима оптимизация условий реакции, хотя есть и некоторые общие положения, помогающие минимизировать альтернативные продукты реакции (Palumbi, 1997).

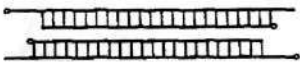
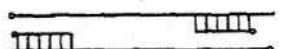
Обычно амплифицируется небольшое число фрагментов (5—10), а длина ампликона не превышает 3—4 тпн. Недостатки RAPD: трудности разграничения полиморфизма и артефактов, отсутствие продуктов PCR при геномных отличиях, появление новых полос, сложность либо невозможность идентификации гомологичных локусов, что создает определенные препятствия его использования в межпопуляционных и межвидовых сравнениях (Palumbi, 1997). Основные преимущества метода заключаются в возможности работать с анонимными геномами, в использовании малого количества ДНК, в эффективности и относительно низкой себестоимости (Hadrys et al., 1992). Любой продукт PCR может быть элюирован из геля, помечен радиоактивной или флуоресцирующей меткой и использован в качестве молекулярного зонда в дальнейших экспериментах. Случайно/произвольно амплифицированная ДНК (RAPD) может быть использована в молекулярной экологии для установления экологической идентичности анализируемых форм, для исследования близкородственных связей,

Разделение цепей
и присоединение
праймера

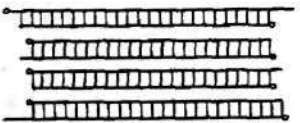
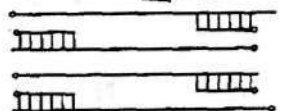
Удлинение праймера
и образование
второй цепи



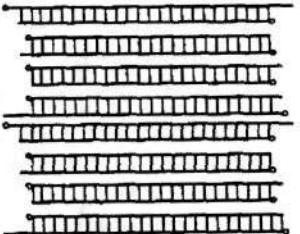
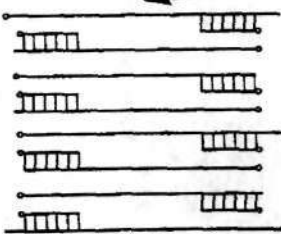
Цикл 1



Цикл 2



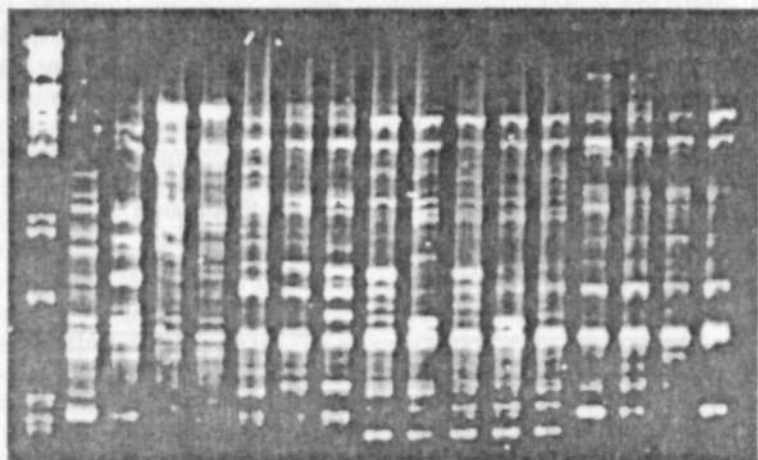
Цикл 3



И т. д.

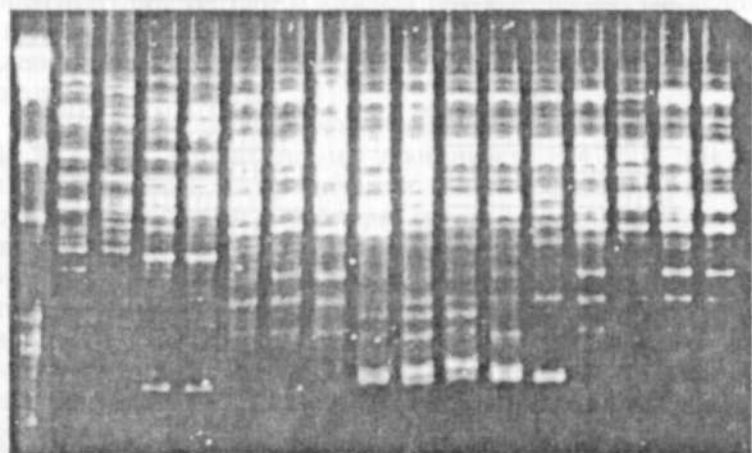


M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16

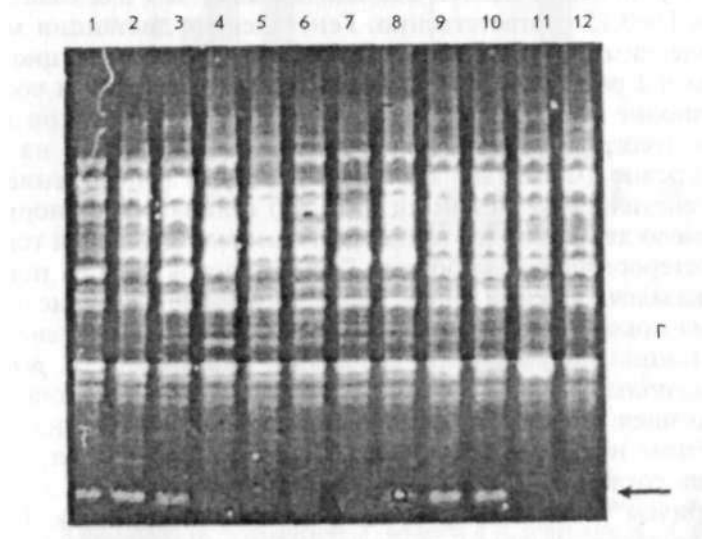
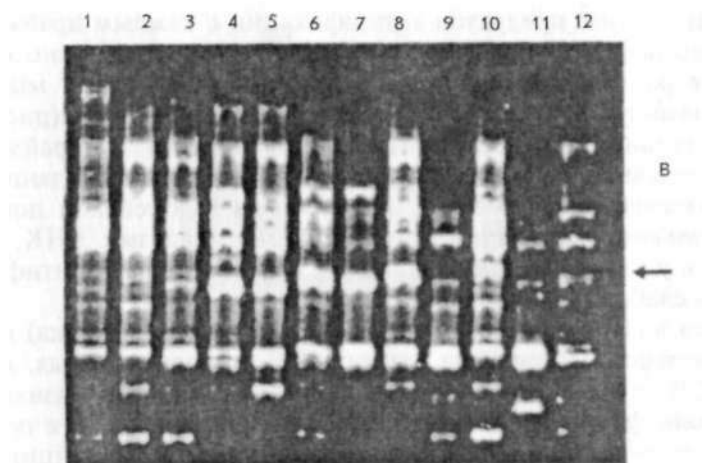


A

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16



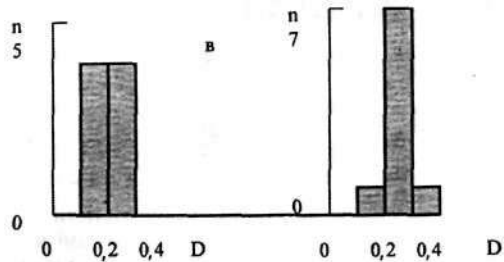
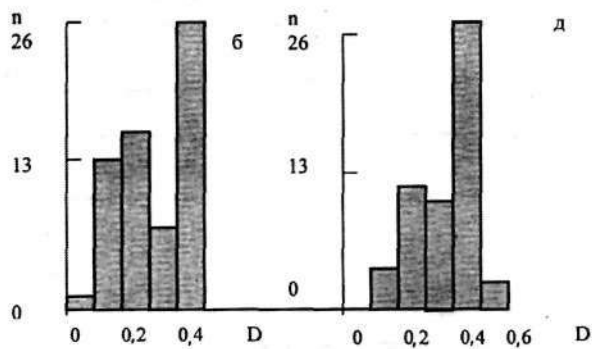
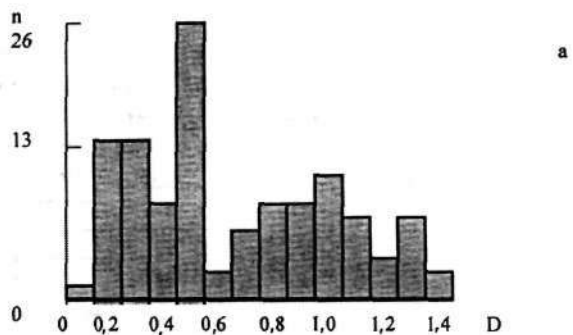
Б

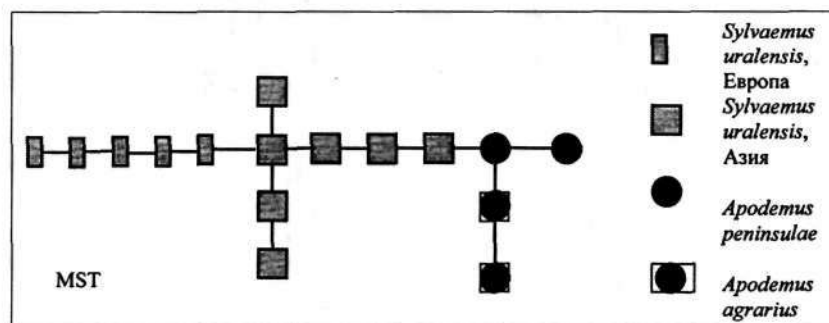
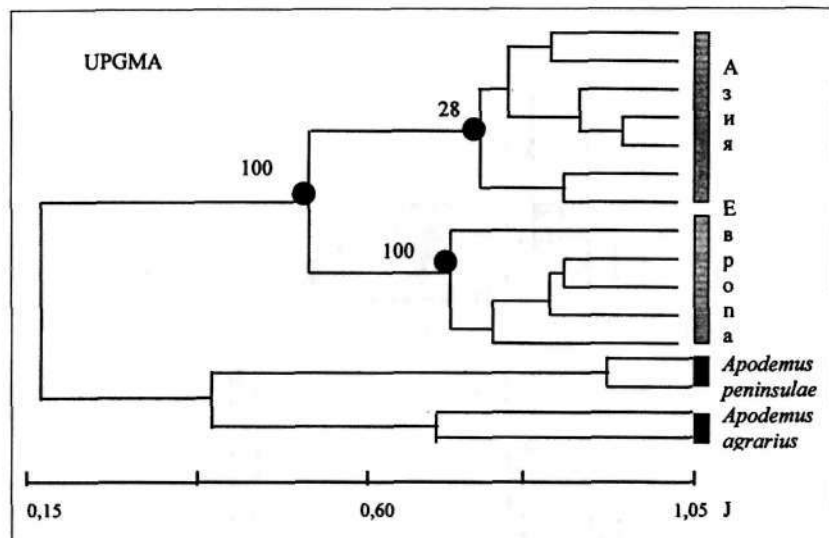


ных. При анализе продуктов амплификации с каждым праймером между географическими формами обнаруживались вполне определенные различия; высокая дивергенция малой лесной мыши с восточноазиатской и полевой мышами была очевидной (рис. 41). Примечательно, что результаты амплификации с праймером ОРС-05 выявили высокую корреляцию молекулярных данных с кариологическими, а именно: все особи из европейской популяции *S. uralensis* характеризовались яркими полосами ДНК, в то время как у азиатских форм в данной части спектра идентифицировались слабовыраженные фрагменты.

Всего в геномах малых лесных мышей (малая выборка) идентифицировано 102 признака, из них 68 % — полиморфных, в том числе 62 % — для восточноевропейских и 65 % — для азиатских форм. Доля фиксированных отличий составила 6,8 % для первой и 4,9 % — для второй популяции. Генетические дистанции для восточноевропейских мышей оказались выше, чем для азиатских: $D=0,20$ и $D=0,15$ соответственно. Генетические дистанции между географическими популяциями превышали внутрипопуляционные более чем в 2 раза: $D=0,43$. Такие различия (их уровни и соотношения) вполне сопоставимы с теми, что наблюдаются при классическом (географическом) видообразовании грызунов на изозимном уровне (Фрисман, Павленко, 1987). Распределение парных генетических дистанций (рис. 42) отличалось от нормального и имело два пика, что является показателем высокой генетической гетерогенности выборки. Генный поток между популяциями оказался низким: генная фиксация $F_{st}=0,59$, а число мигрантов на поколение $N_m=0,35$. Самые высокие оценки генетических дистанций получены при сравнении *S. uralensis* с *A. peninsulae* и *A. agrarius*: $D=0,84$ и $D=1,07$ соответственно, что согласуется с имеющимися по данной группе данными (см. гл. 1,2 наст. работы). Фено- и филограммы (рис. 43) распределяют малую лесную мышь согласно географической принадлежности на два кластера, причем азиатские формы формируют два подкластера. MST-дерево такое деление поддерживает, указывая, что восточноевропейские и азиатские популяции *S. uralensis* объединяются через мышь Туркмении (Челомина и др., 2000).

Таким образом, анализ результатов RAPD-PCR свидетельствует о достаточно высокой генетической дифференциации двух кариоморф, отчетливо выявляя генетическое своеобразие малых





ческие дистанции и наличие фиксированных геномных отличий в совокупности с указанными выше морфологическими и кариологическими отличиями позволяют нам придерживаться мнения, что сравниваемые формы вполне могут быть видами на стадии становления или полувидами в рамках концепции надвида. Тем не менее для корректности окончательного заключения необходимо привлечь дополнительные быстро эволюционирующие молекулярные маркеры, прежде всего имеющие особый тип наследования гены мтДНК и локусы микросателлитов геномной ДНК.

Рассматривая возможные причины, определившие образование хромосомных рас *S. uralensis*, А. С. Богданов (2002) предполагает, что заселение азиатских территорий малой лесной мышью, скорее всего, произошло в период микулинского межледниковья (70—130 тыс. лет назад), а разделение ареала вида на европейскую и азиатскую части осуществлялось в последний ледниковый период. Именно полное обособление определило формирование генетического хиатуса между европейской и азиатской частями популяции *S. uralensis*. Автор отмечает, что аналогичным образом объясняется возникновение европейской и сибирской популяционных группировок обыкновенной бурозубки *Sorex araneus*.

Заключение

Заинтересовавшись какой-нибудь простенькой биологической проблемой и приступив к ее изучению, мы вдруг обнаруживаем, что по мере углубления в нее возникает множество вопросов, отчего проблема все более усложняется.

К. Шмидт-Нильсен

Многообразие — одно из самых удивительных свойств живой природы, и складывается оно из дискретных единиц — видов (Майр, 1968), интегрирующих в себе свойства клетки, организма, популяций. Эти свойства определены геномом, подобно виду интегрирующим в себе свойства отдельных нуклеотидов, индивидуальных последовательностей ДНК/генов и их семейств. Совокупность изложенных данных, а именно особенности ПДРФ суммарной и рибосомной ДНК ядер, полиморфизма амплифицированных с помощью случайных праймеров последовательностей ДНК, а также характера распределения мутационных замен в структурных генах (цитохром *b* мтДНК, рРНК и IRBP яДНК), указывает, что дискретность — главная черта молекулярной организации эукариотического генома. Тем самым подтверждается основной тезис о том, что дискретность жизни — один из наиболее фундаментальных законов природы.

Экспериментальные, а также литературные данные позволяют с достаточной убедительностью заключить, что основные механизмы формирования и молекулярной эволюции как структурных генов, так и часто повторяющихся (организованных tandemно и диспергированных) последовательностей ДНК генома эукариот имеют сходный характер в разных филетических группах позвоночных. Размерные характеристики и количественное содержание различных семейств повторяющейся ДНК коррелируют между собой и с эволюционным возрастом видов. В частности, эволюция сатДНК мышевидных грызунов, подобно таковой хищников и врановых птиц (Иванов и др., 1991; Челомина и др., 1995а), отражает многоэтапный процесс с участием механизмов селективной амплификации. Как у грызунов (собственные дан-

ные), так и у приматов (Джиллеспии и др., 1986) эволюционное старение филумов сопровождается сокращением количества семейств диспергированных повторов. У обезьян Старого и Нового Света, а также приматов и человека обнаруживается соответственно одно, два или три семейства Крп-последовательностей, принадлежащих к классу LINES. Аналогичным образом у эволюционно молодых западнопалеарктических видов лесных мышей содержатся два, а у эволюционно более старых восточнопалеарктических видов — одно EcoRI семейство, представляющее LINES.

Обобщение имеющихся данных позволило предложить гипотезу о «спиральном» характере изменения ПДРФ во времени. В рамках данной гипотезы уровень ПДРФ яДНК в геномах эволюционно молодых, на стадии становления, и эволюционно старых «сложившихся» видов ниже, чем у «развивающихся» форм, но с противоположным вектором. В определенной мере это соответствует гипотезе о возникновении (в результате «взрывной» амплификации) и эволюции (дивергенция и рассеивание последовательностей по геному) сатДНК эукариот, сформулированной Р. Бриттенем и Е. Дэвидсоном (Britten, Davidson, 1968) в самом начале по сей день бурных исследований молекулярной организации эукариотического генома и может рассматриваться как ее экспериментальное подтверждение. Спиральный характер процесса может быть графически представлен в виде синусоиды, по одной оси которой время, а по другой — разнообразие последовательностей ДНК. Такие изменения генома соответствуют известным популяционным флуктуациям численности (именуемым «волнами жизни»), чередованию пиков подъема и спада видо- и родообразовательных процессов (по крайней мере, что касается грызунов), а также характеру общего развития биоразнообразия нашей планеты. Таким образом, полученные результаты являются подтверждением единства структуры и функции органического мира, главной стратегии его развития.

Рассматривая проблему вида с позиций эволюционной экологии, мы особое внимание уделили изучению сатДНК, адаптивная роль которой широко обсуждается. Вопреки имевшим место представлениям о сатДНК лесных и полевых мышей как достаточно консервативной части генома нами продемонстрирована ее чрезвычайная вариабельность, и не только по количественному содержанию, но также по нуклеотидной последовательности, протяженности основного мультимера и типу внешней сегментации.

Помимо известного 370 пн мы обнаружили новые типы сатДНК с длиной мономеров, равной 240 пн и 30 пн, названные нами «*Rattus*»-, «*Mus*»- и «*Apodemus*»-*mnoM* соответственно. Дифференциация видов *Apodemus* и *Sylvaemus* по типам их сатДНК совпадает с географическим распространением, внутривидовой таксономией, а также системой матриархальных связей. «*Rattus*»-*Tun* сатДНК доминирует у наиболее поздно радирировавших видов северо-западной Палеарктики, «Л/и5»-тип сатДНК оказался характерным лишь для южнопалеарктического вида (представляющего, очевидно, наиболее древнюю эволюционную ветвь лесных мышей), а «*Apodemus*»-*TMn* сатДНК (в действительности высокогетерогенный, в отличие от первых двух) объединяет эволюционно старые виды северо-восточной Палеарктики. Примечательно, что в геномах лесных мышей оказались типы внешней сегментации сатДНК, обнаруженные как у эволюционно более молодых видов рода *Rattus*, так и более старых, чем представители «*Apodemus*», видов рода *Mus* (т. е. соответственно «последовательности-потомки» и «последовательности-предшественники»), что может рассматриваться в пользу гипотезы существования «библиотеки» последовательностей сатДНК в геномах млекопитающих (Salser et al., 1976). С другой стороны, если придерживаться точки зрения об одновременной дифференциации родов *Mus*, *Apodemus* и *Rattus* от общего предка/предков (Vonhomme et al., 1984), эти данные можно трактовать не только как существование «библиотеки» сатДНК в геномах грызунов, но и как свидетельство ретикулярноеTM эволюции рассматриваемых таксонов.

Обобщение многочисленных литературных данных и результатов собственных исследований позволило также разработать гипотетическую схему молекулярной организации и эволюции сатДНК мышевидных грызунов. Согласно логике наших рассуждений многообразии типов внешней сегментации сатДНК лесных мышей, имеющей сложную иерархическую структуру, в конечном счете обусловлено различными комбинациями базисных последовательностей, имеющих размер, равный примерно 28 и 30 пн, и селективной амплификации, причем таксономическим весом обладает тип внешней, а не внутренней сегментации. Данная схема демонстрирует также тесное родство между геномами грызунов и приматов.

Известно, что любой биологический вид своеобразен на каждом уровне его организации: генетическом, морфофизиологиче-

ском, экологическом. Тем не менее пределы возможности его существования, т. е. эволюционный потенциал, широко варьируют. Способность или неспособность генома к его реорганизации в видообразовательном аспекте детерминируется особенностями его молекулярной организации. Анализируя их, мы не можем не разделять точку зрения авторов (Шварц, 1980; Бердников, 1981), считающих, что «неспециализированные примитивные виды», «которые имеют в данный момент самый обширный ареал», не только «обладают большим запасом неинформативной ДНК», но являются эволюционно активными. Однако, и это справедливо замечают их оппоненты (Бауэр, 1936; Стегний, 1993), виды с лабильным геномом имеют большие потенции к генерации новых видов. Наиболее гармоничным нам представляется эволюционное развитие таксонов (по крайней мере, у лесных и полевых мышей) с чередованием форм, имеющих консервативные и лабильные геномы. Первые дают материал для эволюции, вторые — его реализуют. В таком случае можно предположить, что группа лесных и полевых мышей по крайней мере трижды в своей эволюционной истории имела виды с лабильным кариотипом, давшие всплеск адаптивной радиации. Действительно, результаты филогенетических реконструкций этой группы грызунов дают высокие вероятностные оценки для эволюционных древ в форме по крайней мере двух кустов Северной Палеарктики (западного — европейского и восточного — азиатского) и одного южнопалеарктического. Появление таких видов можно, в частности, связать с межвидовой гибридизацией. Гибридизация, как мы отмечали, очевидно, могла иметь место внутри «*Apodemus*» (хотя эта гипотеза, не получившая после Н.И. Лариной экспериментального подтверждения, была отвергнута), так как последовательность отделения видов в их эволюционных филумах по данным мтДНК и яДНК несколько различается. Возможно, свидетельством тех событий является наличие в геноме *A. argenteus* не 48, как у всех лесных и полевых мышей, а 46 хромосом, у *A. speciosus* — двух кариоморф, с $2p=48$ и $2p=46$. Широкую межвидовую гибридизацию могут инициировать глобальные экологические кризисы (Красилов, 1992), с которыми эволюционная история «*Apodemus*» широко ассоциируется. Кроме того, невозможность межвидовой гибридизации в настоящее время не может являться доказательством, что такая гибридизация не могла проходить в прошлом. Таким образом, можно полагать, что для поступательной эволюции

(по крайней мере, некоторых групп видов) необходимо чередование лабильных и консервативных геномов. В противном случае правы те авторы, которые считают, что широкую радиацию видов следует ожидать от экологически пластичного широко адаптированного предка.

Согласно данным (Челомина и др., 1990), молекулярная эволюция высоких повторов у видов лесных мышей действительно имеет принципиальные отличия от таковой у кариологически лабильных групп (например, песчанок рода *Meriones*). Кариологически стабильные и широко адаптированные лесные мыши высоко вариабельны по данным ПДРФ тандемной и диспергированной ДНК, в то время как у более специализированных и кариологически высоколабильных песчанок почти одинаковые картины рестрикции суммарной яДНК. Тем не менее нами было замечено, что как у малоазиатской песчанки, характеризующейся самым высоким для рода *Meriones* хромосомным числом и внутривидовым кариотипическим полиморфизмом, так и у восточноазиатской лесной мыши, выделяющейся не только среди всех родственных видов, но и других таксонов млекопитающих высоким числом и полиморфностью добавочных хромосом, геномы характеризуются наличием видоспецифичных низкомолекулярных сателлитных компонентов (длиной 20 и 30 пн). Маловероятно, что совпадение этих двух событий сопряженности появления низкомолекулярного сателлитного компонента с высоким кариотипическим полиморфизмом видов имеет случайный характер (причем оба сателлита дискриминирует одна и та же рестриктаза — *VspRI*). Очевидно, выявленные нами структуры тесно связаны с хромосомными перестройками грызунов и, возможно, с их адаптивными возможностями и эволюционным потенциалом.

При изучении молекулярной организации генома лесных мышей нами впервые был применен дифференциальный подход в использовании ферментов рестрикции. Принимали во внимание те факты (не учитываемые большинством авторов), что, во-первых, различные нуклеотиды мутируют с разной скоростью, а во-вторых, содержание GC-пар в геномах млекопитающих строго регламентировано. Их игнорирование, с нашей точки зрения, недопустимо, так как на интерпретацию данных они могут оказывать значительное влияние. Действительно, как показали наши

результаты, гипотетические филогенетические древа, построенные по данным ПДРФ яДНК, генерируемого рестриктазами, специфичными к GC-богатым сайтам рестрикции, а также к сайтам, содержащим все 4 азотистых основания (предположительно, eatДНК), оказались различными. Такой результат можно объяснить тем, что GC-богатые участки генома грызунов являются молекулярными маркерами событий, эволюционно значимых [для крупных таксонов. В то же время можно полагать, что результаты исследования участков ДНК со всеми азотистыми основаниями в большей мере отражают адаптивную стратегию видов лесных мышей.

Анализ матриархальных связей обнаружил, что группа мышей, объединяемых в секцию «*Apodemus*», имеет несколько (по крайней мере, три) мышей-родоначальниц для каждого из трех филумов. Такое деление на филумы соответствует результатам реконструкций филогенетических связей по данным ПДРФ яДНК: каждому из филумов мтДНК соответствует определенный [тип eatДНК. Кроме того, разработанный нами подход анализа данных ПДРФ яДНК позволил сделать выводы о более высокой специализации северных западнопалеарктических видов и южнопалеарктической лесной мыши и о наличии у них более тесных филогенетических связей по сравнению с остальными видами (северо-восточной Палеарктики); о существовании общего для северопалеарктических видов генетического пула у азиатских видов; о южной Азии как реальном центре формирования «*Apodemus*». Расширение исследований позволило выявить еще одну древнюю филетическую ветвь, представленную непальской мышью.

Согласованность ключевых положений молекулярных филогении, выведенных по данным вариабельности кодирующих и не кодирующих нуклеотидных последовательностей, имеющих разный тип наследования и функциональную роль (часто повторяющиеся последовательности ДНК, гены рРНК и 18S яДНК, ген цитохрома *b* мтДНК), свидетельствует о единой эволюционной стратегии видов лесных и полевых мышей на уровне ядерного и митохондриального геномов, как бы сложно ни проходили их видообразование и эволюция. Сложность эволюционного процесса исследуемой группы грызунов подтверждают данные сравнительного анализа степени дивергенции видов мышей Кавказа на раз-

ных уровнях (морфологическом, кариологическом, изозимном, последовательностей ДНК) их организации, согласно которым сравниваемые виды имеют разную степень отличия по разным системам признаков. Кроме того, данные предполагают, что среди анализированных нами видов могут эффективно протекать не только дивергентные, но и конвергентные процессы.

С точки зрения таксономии имеющиеся данные можно интерпретировать как серьезный аргумент в необходимости более корректной классификации, с приданием группе лесных и полевых мышей надродового статуса, выделением западнопалеарктических видов в отдельный род (что подтверждают недавние выводы российских зоологов, к сожалению, не получившие пока общего признания), северных восточнопалеарктических видов — в монотипические таксоны не ниже подродового ранга (зоологами такое право признается лишь за полевой мышью), а южнопалеарктическую лесную мышь — в отдельный таксон родового ранга (такой вопрос специалистами до нас не поднимался). Представляется также, что есть основания для рассмотрения вопроса о выводе горной мыши из состава *Sylvaemus* с повышением статуса до родового. Необходимость объединения всех лесных мышей в таксон надродового ранга следует из всей совокупности полученных молекулярных данных, из того, что все эти виды тесно связаны общностью происхождения. Они имеют общий (эволюционно консервативный) молекулярный маркер: 1,85 тпн EcoRI-последовательность класса LINES. Напомним, что KpI-последовательности этого же класса маркируют геномы человека и приматов, 1,35 тпн EcoRI-последовательность — геномы видов *Mus*, а 2,24 тпн EcoRI-последовательность — геномы видов *Rattus*. Основные типы сатДНК лесных и полевых мышей могут считаться молекулярными маркерами для таксонов подродового и родового рангов.

Поскольку лесные мыши находятся в глубокой зависимости от лесных ресурсов, их эволюционная история тесно связана с глобальными геологическими изменениями, а также экспансией и развитием широколиственных лесов. Поэтому знание филогенетических взаимоотношений среди видов *Apodemus* и *Sylvaemus* имеет особое значение. К сожалению, имеющаяся информация по данному вопросу пока достаточно ограничена. В частности, определенную негативную роль сыграло то об-

стоятельство, что разными авторами использовались различные наборы видов. Ясно, что для формирования всеобъемлющей филогеографической и эволюционной концепции данной группы видов необходимы дальнейшие исследования с использованием комплекса различных подходов: филогенетических, экологических, геологических.

Период адаптивной дивергенции вида с новыми родовыми свойствами ничтожно мал по сравнению со временем существования и эволюции вида в составе рода (Шварц, 1980). Поэтому ошибка при оценке возраста таксонов с использованием молекулярных часов должна быть минимальной. Имеющиеся данные позволяют оценивать эволюционный возраст лесных и полевых мышей в 10—12 млн лет, что по палеонтологической шкале соответствует миоценовому происхождению. Полученные методом бутстреп-анализа филограммы дали нам возможность предложить следующую гипотезу эволюции видов «*Apodemus*». Результатом первой радиации (дивергенции от общего предка) стало появление южнопалеарктической *A. argenteus*, обитающей на Японских островах, до сих пор сохранивших без значительной деструкции в ледниковом периоде третичные леса (Mielke, 1989). Считают, что почти одновременно с ней возникла *A. gurkha* (Serizawa et al., 2000). В результате второй радиации произошли восточноазиатские виды (*A. peninsulae*, *A. speciosus*, *A. agrarius*) с эволюционным возрастом до 8 млн лет, а третьей, примерно 4 млн лет назад, — западные виды Северной Палеарктики.

Весьма интересным в проблеме происхождения, распространения и эволюции видов «*Apodemus*» является вопрос о причинах и месте возникновения предка западнопалеарктического филума лесных мышей. Если установленный нами эволюционный возраст рода *Sylvaemus* является верным, то радиация данной группы имела место в плиоцене. Таким образом, развитие видового разнообразия в Европе может быть ассоциировано с перемещением широколиственных лесов через исчезновение и развитие новых видов. В Западную Европу они проникли позже, в сопровождении видовой радиации на новых территориях. Таким образом, в ходе молекулярных исследований все более очевидной становится относительность эволюционной молодости западноевропейских лесных мышей. Становится ясно, что временные рамки для них значительно отодвигаются в прошлое.

Если говорить о микроэволюционных процессах лесных мышей, то результаты сравнения двух популяций (европейской и азиатской) *S. uralensis* из восточных частей ее ареала указали на их достоверную дифференциацию, предполагающую 140—430-тысячелетний период раздельной эволюции. Это пример классического географического видообразования. Приблизительно в то же время, по нашим оценкам, дивергировали между собой различные формы ворон (Spiridonova et al., 2000). Совпадение этих событий, очевидно также связано с глобальными климатическими изменениями в Палеарктике. Анализ особенностей внутривидовой дифференциации полевой и красной лесной (японской) мышей представляет ценную информацию, дополняющую наши представления об особенностях молекулярной эволюции, механизмах генных фиксаций и видообразования в островных изолятах. Исследование внутривидовой генетической изменчивости восточноазиатской лесной мыши обнаружило существование двух кладов мтДНК, для популяций Корейского полуострова и Приморья, с крайне низкими значениями их дивергенции. В соответствии с ними на исследуемой территории внутривидовая дифференциация лесной мыши проходила 1—15 тыс. лет назад, т. е. после глобальных климатических изменений, в результате которых многие виды крупных млекопитающих пережили демографическую катастрофу и исчезли либо прошли через генетическое «горлышко бутылки». Таким образом, указанные территории могут рассматриваться как послеледниковые рефугиумы, являющиеся резервуаром генетического разнообразия *A. peninsulae* (Serizawa et al., 2002). Эти результаты обладают значительным элементом неожиданности: недавняя внутривидовая дифференциация *A. peninsulae* резко контрастирует с его высоким (до 10 млн лет) эволюционным возрастом, определенным с помощью разных молекулярных маркеров и в различных исследовательских группах. Контрастируют они и с результатами филогенетических исследований лесных мышей, согласно которым эволюционно наиболее молодые представители колонизовали Северную Палеарктику значительно раньше восточноазиатской лесной мыши. В этой ситуации возникает естественный вопрос, не является ли современная экспансия *A. peninsulae* реколонизацией северо-восточной Азии? К сожалению, отсутствие сведений о палеонтологических находках *Apodemus* на данной территории, делает это предположение маловероятным.

Можно сказать, что видовое разнообразие лесных и полевых мышей имеет четкую функциональную основу и является компромиссом между генетически заложенным потенциалом формообразования и ресурсами среды. Каждый вид формируется системой, в которую он входит, и в свою очередь влияет на эту систему, определяя особенности ее структуры и функционирования. Поскольку эволюция направлена на увеличение разнообразия, ключевыми в исследовании видообразования (значительно более сложного явления, чем внутривидовая дифференциация), филогенетики и систематики являются молекулярно-генетические методы, обогащенные эволюционным подходом. Процесс этого познания неисчерпаем, так как с каждым столетием возникают новые задачи, которые решаются всем методическим и методологическим комплексом биологических наук (Алтухов, 1995; Красилов, 1992; Лопатин, 1997). Первоочередными задачами для молекулярно-генетических исследований в группе лесных и полевых мышей, видимо, следует считать изучение внутривидовой филогенетики и систематики, особенно широкоареальных видов (*S. sylvaticus*, *S. uralensis*, *A. agrarius*, *A. peninsulae*) и определение таксономического ранга ряда морфологических (*S. stankovici*, *S. rusiges*) и генетических (*S. wardi*, *S. hermonensis*, *A. epimelas*, *A. navigator*) форм, а также разработку адекватной филогеографической гипотезы для видов Юго-Восточной Азии.

Список терминов

- Авторадиография** — метод определения радиоактивно меченных молекул через экспозицию с пленкой, чувствительной к рентгеновским лучам.
- Агароза** — полисахаридная смола, полученная из морских водорослей; агарозный гель используется для разделения молекул ДНК по их молекулярной массе.
- Аденин (А)** — пурин, одно из азотистых оснований ДНК и РНК.
- Алель** — одна или более альтернативных форм гена в отдельных локусах.
- Апоморфия** — признак, произошедший не от предкового признака.
- Асимметричная ПЦР (PCR)** — полимеразная цепная реакция, продуцирует одноцепочечную ДНК (с одной или обеих цепей); отношение праймеров обычно равно 50:1 или 100:1; амплифицированная таким образом одноцепочечная ДНК может быть секвенирована без предварительного клонирования.
- Бактериофаг** — вирус, чьим хозяином является бактерия.
- Бескорневое дерево** — филогенетическое древо, в котором локализация наиболее недавнего общего предка таксона неизвестна.
- Блот-гибридизация по Саузерну** — метод, разработанный Е.М. Саузерном для переноса фрагментов ДНК из агарозного геля на нитроцеллюлозный фильтр с помощью фильтровальной бумаги (капиллярный эффект) и последующей гибридизации с радиоактивно меченными пробами ДНК.
- Бутстрепинг** — статистический метод, основанный на многократном случайном группировании, отличающемся от первоначального, чтобы обеспечить получение параметра, по которому могут быть рассчитаны пределы достоверности.
- Возвратные мутации** — мутации, возвращающие точку мутации в исходное состояние.
- Высокоповторяющаяся ДНК** — ДНК, состоящая из коротких последовательностей длиной от нескольких до сотен нуклеотидов, которые повторяются в среднем 500 тыс. раз на геном.
- Гаплоид** — клетки или организмы, содержащие одну копию каждой хромосомы.
- Гель-электрофорез** — разделение молекул на основании их электрического заряда и размера.
- Генетические дистанции** — мера эволюционной дивергенции различных популяций видов; наиболее широко используются дистанции по Нею (Nei, 1972): $D = -\ln(I)$.

- Геном** — полный комплект ДНК в организме.
- Геномная библиотека** — случайная коллекция фрагментов ДНК вида, вставленная в вектор; коллекция должна быть достаточно большой, чтобы в нее могли быть включены уникальные последовательности нуклеотидов.
- Гетероплазмия** — сосуществование более одного типа мтДНК внутри клетки или индивидуума.
- Гибридизационная проба** — меченая молекула нуклеиновой кислоты, используемая для идентификации комплементарных или гомологичных молекул.
- Гибридизация нуклеиновых кислот** — связывание двух комплементарных нитей ДНК или ДНК и РНК для определения интересующей последовательности.
- Гомологичные гены** — два гена разных организмов, имеющих поэтому разную последовательность нуклеотидов, но кодирующих один и тот же генный продукт.
- Гомоплазмия** — феномен, приводящий к сходству по причинам, не связанным с наследованием от общего предка.
- Гуанин (Г)** — пурин, один из нуклеотидов в ДНК и РНК.
- Дезоксирибонуклеаза** — фермент, разрывающий молекулу ДНК.
- Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК)** — молекула, содержащая генетическую информацию; состоит из химически связанных последовательностей нуклеотидов.
- Делеция** — потеря части генетического материала из хромосомы; размер может варьировать от одного нуклеотида до многих генов.
- Дендрограмма** — разветвленная диаграмма, представляющая эволюционную историю группы организмов.
- Диплоид** — клетки или организмы с двумя копиями хромосом.
- Дистанционные матричные методы** — методы филогенетических реконструкций, использующие генетические дистанции, как, например, UPGMA.
- Дистанция** — мера различия между двумя объектами. Значение дистанций между нуклеотидными последовательностями высчитывается по формуле $d = -b \ln(1 - (1 - S)/b)$, где S — сходство последовательностей (соотношение идентичных сайтов к длине последовательности), b — величина, варьирующая в зависимости от используемой модели. Исходная формула предполагает равную скорость, равновероятность и независимость всех типов замен, неизменность частот нуклеотидов. Двупараметрическая модель Кимуры (K2P) допускает разную скорость замен для транзиций и трансверсий, модель Фельзенштейна (F-81) — варьирование частот оснований, а модель Ха-сегава, Кимуры, Яна (HKY-85) предполагает и то и другое. Наибольшее число допущений в общей модели с обратным временем (GTR), в ней варьируют все параметры.

ДНК-полимераза — фермент, который катализирует формирование ДНК из дезокситрифосфатов, используя одноцепочечную ДНК как матрицу; эукариоты содержат различные ДНК-полимеразы (в ядре, цитоплазме или митохондриях), которые участвуют в репликации, репарации и рекомбинации ДНК.

Добавочные (В) хромосомы — дополнительные хромосомы животных и растений; возможно, произошли от одной из нормальных хромосом.

Инверсия — изменение последовательности ДНК, сопровождаемое перестановкой его сегмента в противоположную ориентацию.

Инсерционная мутация — изменение последовательности ДНК путем встраивания одного или более нуклеотидов.

Интрон — область эукариотической ДНК, кодирующая РНК, которая затем вырезается с помощью сплайсинга.

Клад — эволюционная линия, произошедшая от одиночного стволового вида; ветвь кладограммы.

Кладистическая систематика. Использует только разделенные и производные характеристики как основу классификационных реконструкций; все таксоны должны происходить от общего предка.

Кладограмма. Этот термин используется авторами по-разному: или дендрограмма (древо), использующая принципы парсимонии, или древо, которое изображает исторические отношения среди организмов; в общем длина ветвей на кладограммах случайна, имеет значение только порядок ветвления.

Кластерный анализ — метод иерархического группирования таксонов или последовательностей по сходству или минимальной дистанции; UPGMA — невзвешенный парно-групповой метод средних арифметических; WPGMA — взвешенный парно-групповой метод средних арифметических.

Кодирующая нить — цепь молекулы ДНК, которая несет биологическую информацию гена и которая транскрибируется РНК-полимеразой в мРНК.

Кодоминантные аллели — аллели, генные продукты которых (оба) проявляются в гетерозиготе.

Кодон — триплет нуклеотидов, код для одной аминокислоты.

Конвергентная эволюция — эволюция неродственных видов, приводящая к структурам с поверхностным сходством.

Материнское наследование — наследование, когда признаки передаются с помощью генетических факторов цитоплазмы, включая митохондрии, вирусы и некоторые мРНК, произошедшие от одного материнского родителя; известно также как цитоплазматическое наследование, или экстрахромосомная наследственность.

Методы максимальной парсимонии (MP) — таксономические методы, которые фокусируются на характере наблюдаемых величин и минимизируют число изменений в признаках между видами во всех древах; допускают примерно постоянную скорость изменений. Изме-

нения в каждом узле дерева произведены в соответствии с требованиями последних (предыдущих) изменений, чтобы удовлетворять каждому из двух статусов признака непосредственных потомков. Помимо невозможности учета неравномерности хода эволюции максимально экономные деревья неустойчивы в отношении параллельных и обратных замен.

Методы правдоподобия — анализ данных последовательностей ДНК, который основывается на генетических моделях и обеспечивает основу для статистических выводов. Методы максимального (ML) правдоподобия определяют форму реконструированного дерева, а затем выбирают длину ветвей, чтобы они максимально соответствовали данным этого дерева. Могут анализироваться разные деревья и из них выбрано наиболее оптимальное. Преимуществом метода максимального правдоподобия является возможность учета разнообразных факторов эволюции и устойчивость к неравенству скоростей и разнообразию типов нуклеотидных замен в разных филетических линиях.

Митохондрии — органеллы, имеющиеся в цитоплазме всех эукариот и способные к саморепликации; передаются через яйцеклетки, поэтому имеют материнский тип наследования. Каждая митохондрия окружена двойной мембраной; в митохондриях происходит окислительное фосфорилирование, в результате чего образуется молекула АТФ.

Мобильные генетические элементы — элементы, которые могут перемещаться по геному из одного сайта в другой; разделяются на два класса: перемещающиеся с помощью РНК-посредника и как ДНК.

Молекулярная биология — широко используемый термин для описания биологии, посвященной молекулярной природе гена и его биохимическим реакциям (таким, как транскрипция и трансляция).

Молекулярная генетика — генетические исследования, сфокусированные на молекулярной природе генов и генной экспрессии.

Молекулярная систематика — определение, описание и объяснение молекулярного разнообразия внутри и между видами.

Молекулярная филогения — взаимоотношения групп организмов, которые отражены в эволюционной истории молекул белков и ДНК.

Молекулярные часы — гипотеза, согласно которой молекулы эволюционируют прямо пропорционально времени; поэтому дифференциация между молекулами у двух разных видов может быть использована для установления времени, прошедшего с тех пор, когда два вида отделились от общего предка.

Молчащие замены - изменения в ДНК, которые не влияют на экспрессию или функцию гена либо генного продукта.

Неевские стандартные генетические дистанции — $D = -\ln(I)$, где I — генетическое сходство, т. е. отношение доли сходных генов между и внутри популяций.

Нейтральная теория молекулярной эволюции — теория, по которой большинство нуклеотидных замен в процессе эволюции является в большей мере результатом случайной фиксации нейтральных или почти нейтральных мутаций, а не результатом позитивного отбора по Дарвину. Многие белковые мутации селективно нейтральны и существуют в популяции благодаря балансу между новыми мутациями и их случайным исчезновением. Нейтральные мутации имеют функции, но они в равной мере эффективны по сравнению с предковыми аллелями для выживания и репродуктивного успеха организмов, которые их несут. Нейтральные мутации распространены внутри популяций случайно, так как только относительно небольшое число гамет отбирается каждой генерацией и, таким образом, передается следующей генерации.

Нуклеиновая кислота — полимерная молекула ДНК или РНК.

Нуклеотид — химическое соединение пуринового или пиримидинового азотистого основания с углеводом рибозой или дезоксирибозой и с остатком фосфорной кислоты; мономерная единица ДНК и РНК.

Перенос генов — движение генов или группы генов от донорского организма к реципиенту.

Пиримидин — один из двух типов азотистых оснований, являющихся компонентами нуклеотидов.

Плезиоморфный — признак, используемый для реконструкции филогении и являющийся предковым, или примитивным.

Повторяющаяся ДНК — последовательности ДНК, повторенные некоторое число раз в молекуле или геноме. Некоторые повторы ассоциируются с гетерохроматином, центромерами и теломерами; средние повторы могут кодировать рРНК и тРНК.

Подобие — мера сходства между двумя объектами, цифровые значения обычно располагаются по шкале от 0 до 1.

Полиакриламидный гель — образуется в результате полимеризации мономеров акриламида в линейные цепи, связанные метилен-бис-акриламидом; концентрация акриламида и его отношение с метилен-бис-акриламидом определяют размер пор и прохождение нуклеиновых кислот через гель в зависимости от их размера.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) — метод амплификации ДНК с помощью ДНК полимераз (таких как Taq-полимеразы). ПЦР включает денатурацию двуцепочечной ДНК, добавление дезокситрифосфатов (dNTPs), ДНК полимеразы и праймеров. В результате синтеза ДНК происходит дублирование молекулы, обнаруженной праймерами; повторная денатурация позволяет синтезированным молекулам служить матрицей для повторной амплификации ДНК. Для различных целей разработаны разные модификации метода (ПЦР используют для клонирования генов, производства проб и одноцепочечной ДНК для секвенирования). Различия в ПЦР-продуктах используют для идентификации индивидуумов, популяций и видов.

- Полиморфизм** — два или более генетически различных класса в одной и той же инбредной популяции.
- Полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ)** — полиморфизм индивидуумов, популяций или видов, определяемый с помощью ферментов рестрикции по различиям длины фрагментов ДНК; визуализируется гель-электрофорезом.
- Полинуклеотид** — полимер, состоящий из нуклеотидов.
- Прерывистые гены** — гены, в которых генетическая информация разделена на два или более различных экзонов, разделенных вставками (нитронами), обычно некодирующими; большинство генов эукариот являются прерывистыми.
- Проба** — молекула, меченная радиоактивным изотопом или другой меткой, которая используется для идентификации или получения гена, генного продукта или белка.
- Пурин** — один из двух типов азотистых оснований, являющихся компонентами нуклеотидов.
- ПЦР со случайными праймерами (RAPD-PCR)** — полимеразная цепная реакция, использующая одиночные праймеры длиной 10–20 пн.
- Рестрикционный сайт** — специфическая последовательность нуклеотидов на участке двуцепочечной ДНК, которая узнается ферментами рестрикции.
- Рибосомная РНК (рРНК)** — структурный компонент рибосом; гены рРНК являются тандемно повторяющимися единицами, локализованными в районах ядрышкового организатора (ЯОР) хромосом эукариот; каждая единица содержит три гена (для 28S, 18S и 5,8S рРНК).
- Сателлитная ДНК** — высокоповторяющиеся последовательности ДНК с однообразным нуклеотидным составом, при центрифугировании в градиентах плотности солей тяжелых металлов формирующие отдельные (ясно отличимые от основной ДНК) пики; нуклеотидный состав отличается по сравнению с основной ДНК эукариот (они либо АТ-богатые, либо GC-богатые, т. е. соответственно или легкие, или тяжелые); обычно имеют очень высокую (миллионы копий) повторяемость в геноме.
- Секвенирование ДНК** — определение порядка нуклеотидов в молекуле ДНК.
- Секвенирование по Максаму и Гилберту** — химический метод секвенирования ДНК, разработанный в 1977 г. А.М. Максамом и У. Гилбертом. В однострочечной ДНК избирательно делаются разрывы, 5-концы метятся радиоактивным фосфором, после чего проводятся электрофорез в полиакриламидных гелях и радиоактивная идентификация фрагментов.
- Согласованная эволюция** — поддержание гомогенности нуклеотидных последовательностей среди членов семейства генов; члены семейства эволюционируют не независимо.

- Сплайсинг** — процесс удаления интронов и объединения экзонов в мРНК.
- Среднеповторяющаяся ДНК.** Состоит из сегментов длиной 100—500 пн, повторяется от 100 до 10 тыс. раз на геном; этот класс последовательностей включает гены тРНК и рРНК.
- Структурный ген** — ген, который кодирует молекулу РНК или белка.
- Тақ ДНК-полимераза** — ДНК-полимераза, выделяемая из *Thermits aquaticus*, который толерантен к высоким температурам; используют в полимеразной цепной реакции.
- Таксономия** — принципы и процедуры, в соответствии с которыми виды получают название и присоединяются к таксономическим группам.
- Таксоны** — общий термин для таксономических групп любого ранга.
- Точковые мутации** — изменение в одной нуклеотидной паре молекулы ДНК.
- Фонограмма** — разветвленная диаграмма, которая связывает разные таксоны через установление общего сходства признаков; признаки не оцениваются как примитивные или производные.
- Фенограмма UPGMA.** Применяет дистанционные измерения для группирования таксономических единиц в фенетические кластеры невзвешенно парно-групповым методом, используя средние арифметические значения.
- Филогенетика** — реконструкция эволюционной истории групп таксонов или генов.
- Филогенетическое древо** — графическое представление эволюционной истории групп таксонов или генов.
- Филогения** — Эволюционная история групп таксонов или генов, или их предков.
- Цитозин (С)** — пиримидин, одно из оснований ДНК и РНК.
- Эволюционная систематика** — методы, сфокусированные на порядке возникновения линий, количестве и природе изменений.
- Экзон** — один из кодирующих участков прерывистого гена.
- Экзонуклеаза** — нуклеаза, которая деградирует молекулу нуклеиновой кислоты, разрезая ее вдоль по направлению от 3'- к 5'-концу.
- Электрофорез** — разделение молекул в электрическом поле.
- Эндонуклеазы рестрикции** — ферменты, которые разрезают ДНК только в ограниченном числе специфических нуклеотидных последовательностей, называются также ферментами рестрикции.
- Эукариоты** — организмы с клетками, содержащими мембран-связанные ядра, которые репродуцируются в мейозе; клетки делятся митозом; окислительные ферменты локализованы внутри митохондрий.
- Этидийм бромид** — краситель, связывающийся с двуцепочечной ДНК встраиванием между нитями; такая ДНК флуоресцирует в ультрафиолетовом свете.
- Ядерный геном** — часть генома, содержащаяся в хромосомах ядра эукариот.

Список сокращений

| | |
|--------------|--|
| A (A) | — аденин |
| T(G) | — гуанин |
| T (T) | — тимин |
| Ц (C) | — цитозин |
| ДНК | — дезоксирибонуклеиновая кислота |
| мтДНК | — митохондриальная ДНК |
| пн | — пар нуклеотидов (тпн — тысяч пар нуклеотидов) |
| рДНК | — рибосомная ДНК |
| ядНК | — ядерная ДНК |
| МДГ | — мобильные генетические элементы |
| ПДРФ (RFLP) | — полиморфизм длин рестрикционных фрагментов |
| ПЦР (PCR) | — полимеразная цепная реакция |
| РНК | — рибонуклеиновая кислота |
| мРНК/иРНК | — информационная РНК |
| рРНК | — рибосомная РНК |
| ЯОР | — район ядрышкового организатора |
| cyt <i>b</i> | — цитохром <i>b</i> |
| D | — генетические дистанции |
| I | — генетическое подобие |
| IRBP | — интерфоторетиноидсвязывающий белок |
| Fst | — генная фиксация |
| ML | — максимальное правдоподобие |
| MP | — максимальная парсимония |
| NJ | — ближайшее связывание |
| Nm | ~ число мигрантов на поколение |
| Ts | — транзиции |
| Tv | — трансверсии |
| UPGMA | — невзвешенный парногрупповой метод средних арифметических |

Литература

- Айяла Ф., Кайгер Дж. Современная генетика. М.: Мир. 1988. Т. 3. 335 с.
- Алтухов Ю.П., Рынков Ю.Г. Генетический мономорфизм вида и его биологическое значение // Журн. общ. биологии. 1972. Т. 33. С. 282—300.
- Алтухов Ю.П. Популяционный и типологический аспекты проблемы вида и видообразования // Современные проблемы теории эволюции. М.: Наука, 1993. С. 5-16.
- Алтухов Ю.П. Генетика популяций и сохранение биоразнообразия // Соросовский образовательный журнал. 1995. №1. С. 32—43.
- Аргиропуло А. И. К вопросу об индивидуальной и географической изменчивости у некоторых видов рода *Apodemus* // Тр. Зоол. ин-та АН СССР. 1946. Т. 8, № 3. С. 195-220.
- Банникова А.А., Долгов В.А., Федорова Л.В. и др. Родственные отношения ежей подсемейства Eginaseinae (Mammalia, Insectivora) по данным рестриктазного анализа суммарной ДНК // Зоол. журн. 1995. Т. 74, вып. 5. С. 90-106.
- Банникова А.А., Долгов В.А., Федорова Л.В. и др. Дивергенция землероек (Insectivora, Soricidae) по данным рестриктазного анализа повторяющихся последовательностей ДНК // Зоол. журн. 1996. Т. 75, вып. 2. С. 256-270.
- Бауэр Э.С. Проблемы эволюции в свете теории живой материи: Памяти К.А. Тимирязева. М.; Л.: Биомедгиз, 1936. 225 с.
- Бекасова Т.С., Воронцов Н.Н., Коробицына К.В., Кораблев В.П. В-хромосомы и сравнительная кариология мышей рода *Apodemus* // Генетика. 1980. Т. 52-53. С. 33-44.
- Бекасова Т.С. Сравнительная кариология и систематика некоторых мышеобразных Muridae азиатской части СССР: Автореф. дис. ...канд. биол. наук. Владивосток, 1980.
- Бекасова Т.С. В-хромосомы азиатских лесных мышей *Apodemus peninsulae* (Rodentia, Muridae) // Вопросы изменчивости и зоогеографии млекопитающих. Владивосток, 1984. С. 14—29.
- Бердников В.А. Эволюция и прогресс. Новосибирск: Наука, 1991. 230 с.
- Бирштейн В.Я. Цитогенетические и молекулярные аспекты эволюции позвоночных. М.: Наука, 1987. 283 с.
- Богданов А.С. Цитогенетическое исследование лесных мышей (*Sylvaemus*, Muridae, Rodentia) северо-западных районов Копетдага // Систематика и филогения грызунов и зайцеобразных / Под ред. А.К. Агаджаняна, В.Н. Орлова. М., 2000. С. 24-26.
- Богданов А.С. Хромосомная дифференциация популяций малой лесной мыши *Sylvaemus uralensis* в восточной части ареала // Зоол. журн. 2001. Т. 80. С. 331-342.

Богданов А. С. Изучение ранних стадий дивергенции в группе лесных и полевых мышей с помощью молекулярно-генетических методов: Автореф. дис. ...канд. биол. наук. М., 2002. 15 с.

Боескоров Г.Г., Ляпунова Е.А., Белянин А.Н. и др. Ядрышкообразующие районы хромосом лесных мышей (*Apodemus* s. 1.) // Эволюционные и генетические исследования млекопитающих. Владивосток, 1990. Т. 2. С. 3-4.

Боескоров Г.Г., Картавцева И.В., Загороднюк И.В. и др. Ядрышкообразующие районы и В-хромосомы лесных мышей (Mammalia, Rodentia, *Apodemus*) // Генетика. 1995. Т. 31, № 2. С. 185-192.

Борисов Ю.М. Система В-хромосом — маркер популяции *Apodemus peninsulae* (Rodentia, Muridae) в Прибайкалье // Генетика. 1990а. Т. 26. С. 2215-2225.

Борисов Ю.М. Цитогенетическая структура популяций *Apodemus peninsulae* (Rodentia, Muridae) в Западных Саянах // Генетика. 1990б. Т. 26. С. 1484-1491.

Борисов Ю.М. Цитогенетическая дифференциация популяций *Apodemus peninsulae* (Rodentia, Muridae) в Восточной Сибири // Генетика. 1990в. Т. 26. С. 1828-1839.

Борисов Ю.М. Цитогенетическая структура популяций *Apodemus peninsulae* (Rodentia, Muridae) на побережье Телецкого озера (Алтай) // Генетика. 1990г. Т. 26. С. 1212-1220.

Борисов Ю.М., Малыгин В.В. Клинальная изменчивость системы В-хромосом восточноазиатской мыши *Apodemus peninsulae* из Бурятии и Монголии // Цитология. 1991. Т. 33. С. 106-111.

Воронцов Н.Н., Коробицына К.В. Материалы по сравнительной кариологии // Цитология. 1970. Т. 12, № 2. С. 152-157.

Воронцов Н.Н., Бекасова Т.С., Крал Б. и др. О видовой принадлежности азиатских лесных мышей рода *Apodemus* (Rodentia, Muridae) // Зоол. журн. 1977. Т. 56, № 3. С. 437-450.

Воронцов Н.И. Синтетическая теория эволюции: ее источники, постулаты и нерешенные проблемы // Журн. Всесоюз. хим. о-ва им. Д.И. Менделеева. 1980. Т. 25. С. 295-314.

Воронцов Н.Н. Теория эволюции: истоки, постулаты и проблемы. М.: Наука, 1984.

Воронцов Н.Н., Межжерин С. В., Ляпунова Е.А. и др. К систематике лесных мышей Кавказа // Грызуны. Свердловск, 1988а. Т. 1. С. 65-67.

Воронцов Н.Н., Павленко М.В., Ляпунова Е.А. Материалы к электрофоретической диагностике лесных мышей Закавказья // Грызуны. Свердловск, 1988б. Т. 1. С. 67-69.

Воронцов Н.Н., Межжерин С. В., Боескоров Г.Г., Ляпунова Е.А. Генетическая дифференциация видов-двойников лесных мышей (*Apodemus*) Кавказа и их диагностика // Докл. АН СССР. 1989. Т. 309, № 5. С. 1234-1238.

Воронцов Н.Н., Боескоров Г.Г., Межжерин С. В. и др. Систематика лесных мышей подрода *Sylvaemus* Кавказа (Mammalia, Rodentia, *Apodemus*) // Зоол. журн. 1992. Т. 71, № 3. С. 119-131.

Воронцов Н.Н. Развитие эволюционных идей в биологии. М.: Прогресс традиция, 1999.

Газарян К.Г., Тарантул В.З. Геном эукариот. Молекулярная организация и экспрессия. М.: Изд-во МГУ, 1983. 326 с.

Гептнер В.Г. Лесные мыши горного Крыма // Тр. Крым, заповедника. 1940. Т. 2. С. 96-101.

Гептнер В.Г., Слудский А.А. Млекопитающие Советского Союза. М.: Наука, 1972. Т. 2. 551 с.

Гинатулин А.А., Гинатулина Л.К., Калина А.Г., Кораблев В.П. Обнаружение тандемных повторов в геномах сусликов рода *Citellus* с помощью рестриктаз // Молекул, биол. 1980. Т. 26. С. 1005-1014.

Громов И.М., Баранова Г.И. Каталог млекопитающих СССР. Л.: Наука, 1981. 455 с.

Громов И.М. Отряд Грызуны Rodentia // Каталог млекопитающих СССР (плиоцен-современность). Л.: Наука, 1981. С. 75—217.

Громов И.М. Грызуны // Млекопитающие фауны России и сопредельных территорий (зайцеобразные и грызуны): Определитель. СПб.: Наука, 1995. С. 58-520.

Громов И.М., Ербаева М.А. Млекопитающие фауны России и сопредельных территорий. Зайцеобразные и грызуны. СПб., 1995. 552 с.

Джиллести Д., Доунхауэр Л., Страйер Д. Эволюция организации ДНК приматов // Эволюция генома / Под ред. Г. Доувера, Р. Флейвелла. М.: Мир, 1986. С. 119-138.

Доувер Г., Браун С, Коэн Э. и др. Динамика эволюции генома и дифференцировка видов // Эволюция генома / Под ред. Г. Доувера, Р. Флейвелла. М.: Мир, 1986. С. 329-356.

Завадский К.М. Вид и видообразование. Л.: Наука, 1968. 329 с.

Иванов С.В., Потапов В.А., Филипенко Е.А., Ромашенко А.Г. Гетерогенность семейства Vsp-повторов Canidae: обнаружение EcoRI-подсемейства // Генетика. 1991. Т. 27. № 6. С. 973-981.

Инге-Вечтомов С. Г. Генетика с основами селекции. М.: Высш. школа, 1996. 320 с.

Кайданов Л.З. Генетика популяций. М.: Высш. школа, 1996. 320 с.

Картавцева И.В., Павленко М.В., Рослик Г.В. Кариологические особенности восточноазиатской мыши *Apodemus peninsulae* из Тувы // Всесоюз. совещ.: Тез. докл. Владивосток, 1990. Ч. 2. С. 85-86.

Картавцева И.В. Эволюция кариотипа лесных и полевых мышей (Rodentia, Muridae) // Эволюция жизни на Земле: Тез. материалов. II Междунар. симпоз. 2001. С. 103-104.

Картавцева И.В. Кариосистематика лесных и полевых мышей. Владивосток: Дальнаука, 2002. 142 с.

Кимура М. Молекулярная эволюция: теория нейтральности. М.: Мир, 1985. 398 с.

Кирильчик С.В., Слободянюк С. Я., Беликов С. И., Павлова М.Е. Филогенетические взаимоотношения среди 16 видов подкаменщиковых рыб

оз. Байкал на основе анализа нуклеотидной последовательности фрагмента гена цитохрома *B* митохондриальной ДНК // Молекул, биол. 1995. Т. 29. С. 817-825.

Козловский А.М., Ниджафова Р.С, Булатова Н.Ш. Онтогенетический hiatus между симпатрическими формами лесных мышей Азербайджана // Докл. АН СССР. 1990. Т. 315, № 1. С. 219-222.

Коствино В.А. Грызуны (Rodentia) Дальнего Востока России: Автореф. дис. ...д-ра биол. наук. Владивосток, 1997. 46 с.

Костенко В.А. Грызуны (Rodentia) Дальнего Востока России. Владивосток: Дальнаука, 2000. 210 с.

Красиков В.А. Охрана природы: принципы, проблемы, приоритеты. М.: Ин-т охраны природы и заповедного дела, 1992. 174 с.

Курильски Ф., Гашлен Г. Организация генома // Генетика и наследственность. М.: Мир, 1987. С. 96—115.

Лавренченко Л.А., Лихнова О.П. Аллозимная и морфологическая изменчивость трех видов лесных мышей подрода *Sylvaemus* (Rodentia, Muridae, *Arodemus*) Дагестана в условиях симбиотопии // Зоол. журн. 1995. Т. 74, № 5. С. 107-119.

Ларина Н.И. Некоторые данные о межвидовых отношениях (скрещивании лесных и желтогорлых мышей в лабораторных условиях) // Науч. докл. высш. шк. 1962. № 4. С. 37—42.

Лопатин И.К. Разнообразие животного мира: прошлое, настоящее, проблемы сохранения // Соросовский образовательный журнал. 1997. № 7. С. 18-24.

Лушникова Т. П., Омелянчук Л.В., Графодатский А.С. и др. Филогенетические отношения близкородственных видов семейства куницеобразных. Межвидовая изменчивость локализации рестрикционных сайтов BamHI повторов // Генетика. 1989. Т. 25, № 6. С. 1089-1094.

Лушникова Т.П. Повторяющиеся последовательности ДНК геномов куницеобразных: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Новосибирск, 1989. 16 с.

Львов А. Генетика и наследственность. М.: Мир, 1987. 300 с.

Льюин Б. Гены. М.: Мир, 1987. 544 с.

Майр Э. Зоологический вид и эволюция. М.: Мир, 1968. 598 с.

Майр Э. Принципы зоологической систематики. М.: Мир, 1971. 454 с.

Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. М.: Мир, 1984. 479 с.

Медников Б.М., Банникова А.А., Ломов А.А. и др. Рестриктазный анализ ядерной ДНК, критерий вида и механизмы видообразования // Молекул, биол. 1995. Т. 19, вып. 6. С. 1308-1319.

Межжерин С. В. Генетическая дивергенция лесных мышей подрода *Sylvaemus* // Докл. АН СССР. 1987. Т. 269, № 5. С. 1255-1258.

Межжерин С. В. Аллозимная изменчивость и генетическая дивергенция лесных мышей подрода *Sylvaemus* (Ognev et Vorobiev) // Генетика. 1990. Т. 26, № 6. С. 1046-1054.

Межжерин СВ., Зыков А.Е. Аллозимная изменчивость и генетическая дивергенция лесных мышей рода *Apodemus* s. lato // Цитология и генетика. 1991. Т. 25. С. 51-59.

Межжерин СВ., Михайленко А.Г. О видовой принадлежности *Apodemus syhaticus tcherga* (Rodentia, Muridae) Алтая // Вести зоологии. 1991. № 3. С. 35-45.

Межжерин С В., Боескоров Г.Г., Воронцов Н.Н. Генетические связи европейских и закавказских мышей рода *Apodemus* Каир // Генетика. 1992. Т. 28, № 11. С. 111-121.

Межжерин СВ., Зыков А.Е., Морозов-Леонов С. Ю. Биохимическая изменчивость и генетическая дивергенция полевок Arvicolidae Палеарктики: Серые полевки *Microtus* Schrank, 1798, снеговые полевки *Chionomys* Miller, 1908, водяные полевки *Arvicola* Lacerede, 1799 // Генетика. 1993. Т. 29, № 1. С. 2811.

Межжерин СВ., Морозов-Леонов С.Ю., Кузнецова И.А. Биохимическая изменчивость и генетическая дивергенция полевок Arvicolidae Палеарктики. Подземные полевки подрода *Terricola*, настоящие лемминги *Lemmus* Link, 1795, копытные лемминги *Dicrostonyx* Gloger, 1841, степные пеструшки *Lagurus* Gloger, 1842, слепушонки *Ellohius* Fischer von Waldheim, 1814 // Генетика. 1995. Т. 31, № 6. С. 788-797.

Межжерин СВ. Градуализм или пунктуализм: данные по генной дифференциации мелких млекопитающих Голарктики // Генетика. 1997. Т. 33. С. 518-523.

Мельникова М.Н., Гречко В.В., Медников Б.М. Исследование полиморфизма и дивергенции геномной ДНК на видовом и популяционном уровнях (на примере ДНК пород домашних овец и диких баранов) // Генетика. 1995. Т. 31, № 8. С. 1120-1131.

Наджафова Р.С. Таксономия и родственные связи видов семейства Muridae Восточного Закавказья: Автореф. дис. . . канд. биол. наук. М., 1989. 24 с.

Орлов В.Н., Козловский А.М., Наджафова Р.С. Булатова Н.Ш. Хромосомные диагнозы и место генетических таксонов в эволюционной классификации лесных мышей подрода *Sylvaemus* Европы (*Apodemus*, Muridae, Rodentia) // Зоол. журн. 1996. Т. 75, № 1. С. 88-102.

Павленко М.В., Воронцов Н.Н., Бекасова Т. С, Фрисман Л.В. О видовой специфичности электрофоретических спектров белков крови лесных мышей *Apodemus peninsulae* и *A. speciosus* // Вопросы изменчивости и зоогеографии млекопитающих. Владивосток: ДВНЦ АН СССР, 1984. С. 30-42.

Павленко М.В. Внутривидовая дифференциация и геногеография трансферринов у восточноазиатской мыши *Apodemus peninsulae* // Современные подходы к изучению изменчивости. Владивосток: ДВО АН СССР, 1989. С. 61-72.

Павленко М.В. Генетическая дифференциация трех видов *Apodemus* (Rodentia, Muridae) Восточной Палеарктики // Эволюционные генетиче-

ские исследования млекопитающих: Тез. Всесоюз. совещ. Владивосток, 1990. С. 23-24.

Павленко М.В. Внутривидовая генетическая дифференциация и геогеография азиатской лесной мыши *Apodemus peninsulae* (Rodentia, Muridae) // Генетика. 1994. Т. 30. С. 115-116.

Павленко М.В. Белковый полиморфизм и систематика мышей рода *Apodemus*: Автореф. ...канд. биол. наук. Владивосток, 1997. 31 с.

Павлинов И.Я. Кладистический анализ. М.: Изд-во МГУ, 1990. 159 с.

Павлинов И.Я. Концепция внешней группы в кладистике // Журн. общ. биологии. 1990. Т. 50. С. 304-315.

Павлинов И.Я., Яхонтов Е.Л., Агаджанян А.К. Млекопитающие Евразии. I. Rodentia. М.: Изд-во МГУ, 1995. 117 с.

Пантелеев П.А. Грызуны палеарктической фауны: состав и ареалы. М.: ИПЭЭ им. А.Н. Северцова РАН, 1998. 117 с.

Потапов В.А., Соловьев В.В., Ромащенко А.Г. и др. Особенности структуры и эволюции сложных, tandemно организованных, Vsp-повторов генома лисицы. I. Структура и внутренняя организация BamHI-димера // Молекул. биол. 1990. Т. 24. С. 1649-1665.

Прокофьева-Бельювская А.А. Гетерохроматиновые районы хромосом. М.: Наука, 1986. 431 с.

Рубцов Н.Б., Бородин П.М. Эволюция хромосом: от А до В и обратно // Природа. 2002. № 3. С. 1-12.

Скурихина Л.А., Олейник А.Г., Невзипов С. В., Брыков В.А. Филогения дальневосточных лососевых рыб по данным рестриктазного анализа ядерной ДНК // Генетика. 1993. Т. 29, № 9. С. 1508-1518.

Спиридонова Л.Н., Челомина Т.Н., Никольский А.А. и др. Генетические свидетельства межвидовой гибридизации сусликов *Spermophilus major* и *S. erythrognus*: данные RAPD-PCR анализа // Систематика и филогения грызунов и зайцеобразных / Под ред. А.К. Агаджаняна и В.Н. Орлова. М., 2000. С. 163-165.

Стегний В.Н. Архитектоника генома, системные мутации и эволюция. Новосибирск: НГУ, 1993. ПО с.

Турарбеков М.З., Саитбекова Н.Д., Шубина Е.А. и др. Полиморфные повторяющиеся последовательности ДНК в геномах диких и домашних овец // Докл. АН СССР. 1988. Т. 302, № 5. С. 1265-1269.

Федоров А.Н., Гречко В.В., Слободянюк С. Я. и др. Таксономический анализ повторяющихся элементов ДНК // Молекул. биол. 1992. Т. 26, вып. 2. С. 464-469.

Фрисман Л.В., Павленко М.В. Генетическая дифференциация в процессе видообразования (на примере грызунов) // Вопросы эволюционной зоологии и генетики млекопитающих. Владивосток, 1987. С. 4-36.

Хесин Р.Б. Непостоянство генома. М.: Наука, 1984. 472 с.

Челомина Т.Н. Структура и эволюция митохондриальной ДНК млекопитающих (обзор) // Вопросы эволюционной зоологии и генетики млекопитающих. Владивосток: ДВО РАН, 1987. С. 67-87.

Челомина Г.Н. Эволюция митохондриального генома позвоночных: (Обзор) // Современные подходы изучения изменчивости позвоночных. Владивосток: ДВО РАН, 1989. С. 32–42.

Челомина Г.Н., Коробицына К.В., Картавцева И.В. Повторяющаяся ДНК, хромосомный полиморфизм и видообразование песчанок // Генетика. 1990. Т. 26. № 8. С. 1469–1477.

Челомина Г.Н., Пашкова Л.Н. Универсальный характер расщепления часто повторяющейся ДНК червей эндонуклеазами рестрикции // Генетика. 1991. Т. 27. С. 1152–1157.

Челомина Г.Н. Дивергенция двух семейств повторяющейся ДНК лесных и полевых мышей рода *Apodemus* (Muridae, Rodentia) // Генетика. 1993а. Т. 29. С. 1163–1171.

Челомина Г.Н. Дифференциация ГЦ-богатых сайтов рестрикции в часто повторяющейся ДНК лесных и полевых мышей // Генетика. 1993б. Т. 29, № 7. С. 1172–1179.

Челомина Г.Н., Иванов С.В., Крюков А.П. Особенности ПДРФ часто повторяющейся ДНК ворон // Генетика. 1995а. Т. 31. С. 174–179.

Челомина Г.Н., Ляпунова Е.А., Воронцов Н.Н., Сучия К. Молекулярно-генетическое типирование трех представителей транспалеарктического рода лесных и полевых мышей (*Apodemus*, Muridae, Rodentia) // Генетика. 1995б. Т. 31, № 6. С. 820–824.

Челомина Г.Н. Особенности рестрикционного полиморфизма ДНК европейских и азиатских видов лесных мышей рода *Apodemus* // Генетика. 1996. Т. 33, № 10. С. 1381–1386.

Челомина Г.Н. Молекулярная филогения лесных и полевых мышей рода *Apodemus* (Muridae, Rodentia) по данным рестрикционного анализа суммарной яДНК // Генетика. 1998. Т. 34. С. 1286–1292.

Челомина Г.Н., Сузуки Х., Сучия К. и др. Секвенирование гена цитохрома *b* мтДНК и реконструкция матриархальных связей лесных и полевых мышей рода *Apodemus* (Muridae, Rodentia) // Генетика. 1998а. Т. 34, № 5. С. 650–661.

Челомина Г.Н., Павленко М.В., Картавцева И.В. и др. Генетическая дифференциация лесных мышей Кавказа: сравнение изозимной, хромосомной и молекулярной дивергенции // Генетика. 1998б. Т. 34. С. 213–225.

Челомина Г.Н., Богданов А.С., Сузуки Х. Молекулярно-генетическое типирование и таксономическая диагностика восточных популяций малой лесной мыши *Sylvaemus uralensis*: данные RAPD-PCR анализа // Систематика и филогения грызунов и зайцеобразных / Под ред. А.К. Агаджаняна, В.Н. Орлова. М., 2000. С. 179–181.

Челомина Г.Н. Молекулярно-генетические и эволюционные аспекты биоразнообразия животных: Дис. ...д-ра. биол. наук. Владивосток, 2000.

Челомина Г.Н., Сузуки Х. Молекулярная эволюция и филогеография западнопалеарктических лесных мышей рода *Sylvaemus* по данным вариабельности последовательностей ядерного (IRBP) и митохондриального (цитохром *B*) генов // Зоол. журн. 2004. Т. 84.

Чернуха Ю.Г., Евдокимова О.А., Чехович А.В. Результаты кариологических и иммунологических исследований полевых мышей *Apodemus agrarius* из разных районов ареала // Зоол. журн. 1986. Т. 65. С. 471—475.

Шварц С. С. Экологические закономерности эволюции. М.: Наука, 1980. 278 с.

Шедько С. В. Филогения митохондриальной ДНК лососевых рыб подсемейства Salmininae: анализ последовательностей гена цитохрома *b* // Генетика. 2002. Т. 38. С. 1-11.

Шубина Е.А., Медников Б.М. Семейство повторяющихся последовательностей в ДНК дальневосточных лососей рода *Onchorhynchus* // Молекул, биол. 1986. Т. 20. С. 947-956.

Anderson S., Bankier A.T., Barrell B.G. et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome // Nature (London). 1981. V. 280. P. 457-465.

Anderson S., de Bruijn M.H.L., Coulson A.R. et al. Conserved feature of the mammalian mitochondrial genome // J. Mol. Biol. 1982. V. 156. P. 683—717.

Aquadro Ch.F., Greenberg B.D. Human mitochondrial DNA variation and evolution: analysis of nucleotide sequences from seven individuals // Genetics. 1983. V. 103. P. 287-312.

Arnason U., Hoglund M., Widegren B. Conservation of highly repetitive DNA in cetaceans // Chromosoma. 1984. V. 89, N 3. P. 238-242.

Arnason U., Widegren B. Pinniped phylogeny enlightened by molecular hybridization using highly repetitive DNA // Mol. Biol. Evol. 1986. V. 3. P. 356-365.

Arnheim N. Concerted evolution of multigene families // Evolution of genes and proteins. Sunderland, Mass: Sinauer, 1983. P. 38—61.

Arrighi F.E., Hsu T.C., Pathak S., Sawada H. The sex chromosomes of the Chinese hamster: constitutive heterochromatin deficient in repetitive DNA sequences // Cytogenet. Cell Genet. 1974. V. 13. P. 268-274.

Avise J.C., Lansman R.A. Polymorphism of mitochondrial DNA in populations of higher animals // Evolution of genes and proteins / Eds M. Nei, R.K. Koehn. Sunderland, Mass.: Sinauer, 1983. P. 147-164.

Avise J.C., Bermingham F., Kessler E.G., Saunders N.C. Characterization of mitochondrial DNA variability in hybrid swarm between subspecies of bluegill sunfish (*Lipomis macrochirus*) // Evolution. USA. 1984. V. 38. P. 931-941.

Avise J.C., Ball R., Bermingham F. et al. Intraspecific phylogeography. The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics // Ann. Res. Ecol. Syst. 1987. V. 18. P. 489-522.

Avise J.C. Molecular markers, natural history and evolution. L.; N.Y.: Chapman & Hall, 1994. 329 p.

Barrell B.C., Anderson S., Bankier A.T. et al. Different pattern of codon recognition by mammalian mitochondrial transfer-RNAs // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1980. V. 77. P. 3164-3166.

Bekasova T.S., Vorontsov N.N., Korobitsyna K.V., Korablev V.P. B-chromosomes and comparative karyology of mice of the genus *Apodemus* // Genetica. 1980. V. 52. P. 33-43.

Bellinvia E., Munclinger P., Flegr J. Application of the RAPD technique for a study of the phylogenetic relationships among eight species of the genus *Apodemus* // *Folia Zoologica*. 1999. V. 48. P. 241-248.

Bermingham E., Lamb T., Avise J. C. Size polymorphism and heteroplasmy in the mitochondrial DNA of lower vertebrates // *J. Heredity*. 1986. V. 77. P. 249-252.

Bogenhagen D., Clayton D. Number of mitochondrial deoxyribonucleic acid genomes in mouse L and human hela cells qualitative isolation of mitochondrial deoxyribonucleic acid // *J. Biol. Chem.* 1974. V. 249. P. 799-812.

Bonhomme F., Isrander D., Thaler L., Petter F. Electromorphs and phylogeny in muroid rodents // *Evolutionary Relationships Among Rodents* / Eds W.P. Luckett, J. N.Y. Hartenberger. London, 1985. P. 671-683.

Borisova O.K. Landscale and climate of the South-Central and South-Eastern Russia plain during the Pliocene // *Abstr. USGS workshop, Herndon, Virginia, USA, 1993*. P. 61.

Boursot P., Yonekawa K., Bonhomme F. Heteroplasmy in mice with deletion of a large coding region of mitochondrial DNA // *Mol. Uiol. Evol.* 1987. V. 4. P. 46-55.

Britten R.J., Kohne D.E. Repeated sequences in DNA // *Science*. 1968. V. 161. P. 529-540.

Britton-Davidian J., Vahdati M., Benmehdi F. et al. Genetic differentiation in four *Apodemus* species from Southern Europe: *A. sylvaticus*, *A. flavicollis*, *A. agrarius* and *Ax mystacinus* (Muridae, Rodentia) // *Z. saugertierk.* 1991. V. 56^P. 25-33.

Brown G.G., Simpson M. V. Novel feature of animal mtDNA evolution as shown by sequences of two rat cytochrome oxidase subunit II genes // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1982. V. 79. P. 3246-3250.

Brown G.G., Prussick R., Desrolers L.L. A hypervariable site for deletion insertion events in rat mitochondrial DNA and variation in the mtDNA — clones obtained from an individual // *Genetics*. 1983. V. 101. Suppl. P. 9—10.

Brown S.D.M., Dover G.A. Conservation of sequences in related genomes in *Apodemus* constrains the maintenance of satellite DNA sequences // *Nucl. Acids Res.* 1979. V. 6, N 7. P. 2423-2434.

Brown S.D.M., Dover G.A. Conservation of segmental variants of satellite DNA of *Mus musculus* in related species: *Mus spretus* // *Nature*. 1980. V. 285. P. 47-49.

Brown S.D., Dover G Organization and evolutionary progress of a dispersed repetitive family of sequences in wildy separated rodent genomes // *J. Mol. Biol.* 1981. V. 150, N 4. P. 441-466.

Brown W.M., George M., Wilson Jr., Wilson A. C. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA // *Proc. Natl Acad. Sci.* 1979. V. 76. P. 1967-1971.

Brown W.M., Prager E.M., Wang A.W., Wilson A. C. Mitochondrial DNA sequences of primates: tempo and mode of evolution // *J. Mol. Evol.* 1982. V. 18. P. 225-239.

Brown W. M. Evolutionary of animal mitochondrial DNA // Evolution of genes and proteins Sunderland, Mass., 1983. P. 62-88.

Bulatova N., Nadjafova R., Kozlovsky A. Cytotaxonomic analysis of species of the genera *Mus*, *Apodemus* and *Rattus* in Azerbaijan // J. Zool. Syst. Evolut. 1991. V. 29. P. 139-153.

Cann R.L., Stoneking M.K., Wilson A.C. Mitochondrial DNA and human evolution // Nature. 1987. V. 325, N 6099. P. 31-36.

Cerling T.E., Harris J.M., MacFadden B.J. et al. Global vegetation change through the Miocene/Pliocene boundary // Nature. 1997. V. 389. P. 153-157.

Chelomina G.N., Suzuki H., Serizawa K., Tsuchita K. Molecular phylogeny and systematics of the genus *Apodemus* based on nuclear and mitochondrial DNA variation // 3rd European Congress of Mammology: Abstr. Jayvaskyla, Finland. 1999. P. 87.

Clark A.G. Natural selection with nuclear and cytoplasmic transmission. II. Test with *Drosophila* from diverse population // Genetics. 1985. V. 3. P. 97-112.

Clayton D.A. Replication of animal mitochondrial DNA // Cell. 1982. V. 28. P. 693-705.

Clayton D.A. Translation and replication of animal mitochondrial DNA // Int. Rev. Cytol. 1992. V. 141. P. 217-232.

Cluster P.D., Marinkovic D., Allard R.W., Ayala F. Correlation between developmental rates, enzyme activities, ribosomal DNA spacer-length phenotypes and adaptation in *Drosophila melanogaster* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987. V. 9. P. 509-520.

Cooke H.J. Evolution of the long range structure of satellite DNAs in the genus *Apodemus* // J. Mol. Biol. 1975. V. 94, N 1. P. 87-99.

Corbet G.B. The mammals of the Palearctic region: a taxonomic review. L.: Cornell Univ. Press, 1978. 314 p.

Crainhead L., Paetkan D., Reynolds H.V. et al. Microsatellite analysis of paternity and reproduction in Arctic grizzly bears // J. Heredity. 1995. V. 86. P. 255-261.

Csaikl F., Engel W., Schmidtke J. On the biochemical systematics of three *Apodemus* species // Compar. Biochem. Physiol. 1980. V. 65B, N 2. P. 411-414.

Dallas J.F., Dod B., Boursot P. et al. Population subdivision and gene flow in Danish house mice // Mol. Ecol. 1995. V. 4. P. 311-320.

Dandieu S., Rahusl C., Ruffle J., Locoue G. Comparisons des sequences d'ADN hautement repetees chez Liome et diverses especes de primat // Biochem. Syst. Ecol. 1984. V. 12. P. 231-244.

Degnan S.M. The perils of single gene trees - mitochondrial versus single copy nuclear DNA variation in white-eyes (Aves: Zosteropidae) // Mol. Ecol. 1993. V. 2. P. 219-225.

Desjardins P., Morals R. Sequence and gene organization of the chicken mitochondrial genome. A novel gene order in higher vertebrates // J. Mol. Biol. 1990. V. 212. P. 599-634.

- Dobzhansky Th.* Genetics and origin of species. 1st edn. N.Y.: Columbia Univ. Press, 1937.
- Doolittle W.F., Sapienza C.* Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution // *Nature* (London). 1980. V. 284. P. 601-603.
- Dover G* Molecular drive: a cohesive mode of species evolution // *Nature*. 1982. V. 299. P. 111-117.
- Dowling T.E., Moritz C., Palmer J.D.* Nucleic acids // *Molecular systematics* / Eds. D.M. Hillis, C. Moritz. Sinausr. Sunderland, Massachusetts. 1990. P. 250-317.
- Engel W., Vogel W., Voiculescu I.* et al. Cytogenetic and biochemical differences between *Apodemus sylvaticus* and *Apodemus flavicollis*, possibly response for the failure to inbreed // *Compar. Biochem. Physiol.* 1973. V. 44B, №4. P. 1165-1173.
- Fauquette S., Guiot J., Sue J.P.* A method for climatic reconstruction of the Mediterranean Pliocene using pollen data // *Paleogeography, Paleoclimatology, Paleoecology*. 1998. V. 144. P. 183-201.
- Fauquette S., Clauson J., Sue J.P., Zheng Z.* A new approach for paleoaltitude estimates based on pollen records: example of the Mercantour massif (southeastern France) at the earliest Pliocene // *Earth and Planetary Science Letters*. 1999. V. 170. P. 35-47.
- Felsenstein J.* Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap // *Evolution*. 1985. V. 39. P. 783-791.
- Felsenstein J.* PHYLIP (Phylogeny Inference Package) manual version 3.3. Berkeley, California: Univ. Herbarium., 1990.
- Felsenstein J.* PHYLIP, version 3.5c. Department of Genetics. Seattle: Univ. of Wash., 1993.
- Penning T.O.* Origin and evolution of a major satellite DNA // *J. Mol. Biol.* 1987. V. 197. P. 627-634.
- Ferris S.D., Sage R.D., Huang C.M., Nielsen J.T., Ritte V., Wilson A.C.* Flow of mitochondrial DNA across a species boundary // *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*. 1983. V. 80. P. 2290-2294.
- Filippucci M.G., Simson S., Nevo E.* Evolutionary biology of the genus *Apodemus* in Israel: Allozymic and biometric analyses with description of a new species: *Apodemus hermonensis* (Rodentia, Muridae) // *Bull. Zool.* 1989. V. 56. P. 361-376.
- Filippucci M.G.* Allozyme variation and divergence among European, Middle Eastern and North African species of the genus *Apodemus* (Rodentia, Muridae) // *Israel. J. Zool.* 1992. V. 38. P. 193-218.
- Filippucci M.G., Macholan At., Storch G.* Taxonomy of the genus *Sylvaemus* in western Anatolia — morphological and electrophoretic evidence (Mammalia: Rodentia: Muridae) // *Senckenbergiana Biologica*. 1996. V. 75. P. 1-14.
- Fukushi D., Kuro-o M., Obara Y., Tsuchiya K.* Molecular cytogenetic analysis of the highly repetitive DNA in the genome of *Apodemus argenteus*, with comments on the phylogenetic relationships in the genus *Apodemus* // *Cytog. Cell Genet.* 2001. V. 92. P. 254-263.

Gamperl R., Ehmann Ch., Bachmann K. Genome size and heterochromatin variation in rodents // *Genetica*. 1982. V. 58. P. 199-212.

Gemmeke H. Protein variation and Taxonomie in der Gattung *Apodemus* (Mammalia, Rodentia) // *Z. Saugetierk.* 1980. V. 45. N 6. P. 348-365.

Gemmeke H. Protein variation bei Zwergwaldmäusen (*A. microps* Kratochvil & Rosicky, 1952) // *Z. Saugetierkunde*. 1983. V. 48. P. 155-160.

Gillespie D., Donehower L., Srayner D. Evolution of primate DNA organization // *Gene Evolution*. 1982. V. 20. P. 113-1333.

Glemet H., Blier P., Bernatchez L. Geographical extent of Arctic Char (*Salvelinus alpinus*) mtDNA introgression in brook char populations (*S. fontinalis*) from eastern Quebec, Canada // *Mol. Ecol.* 1998. V. 7. P. 1655-1662.

Gupta R.C. Nucleotide sequence of a reiterated rat DNA fragment // *FEBS Letters*. 1983. V. 164. N 1. P. 175-180.

Gyllensten U., Wilson A.C. Interspecific mitochondrial DNA transfer and the colonization of Scandinavia by mice // *Genet. Res.* 1987. V. 49. P. 25-29.

Gyllensten U., Wharton D., Josefson A., Wilson A.C. Paternal inheritance of mitochondrial DNA in mice // *Nature (London)*. 1991. V. 352. P. 255-257.

Hadrys H., Balick M., Schierwater B. Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology // *Mol. Ecol.* 1992. V. 1. P. 55-63.

Hare M.P. Prospects for nuclear gene phylogeography // *Trends Ecol. Evol.* 2001. V. 16. P. 700-706.

Hartl G.B., Suchentrunk F., Willing R., Markowski J., Ansorge H. Inconsistency of biochemical evolutionary rates affecting allozyme divergence within the genus *Apodemus* (Muridae, Mammalia) // *Biochem. Syst. Ecol.* 1992. V. 20. P. 363-372.

Hatch F.T., Bodner A.J., Mazrimas J.A., Moore D.H. Satellite DNA quantity satellite DNA and karyotypic variation in kangaroo rats (genus *Dipodomys*) // *Chromosoma (Berl.)*. 1976. V. 58. P. 155-168.

Hauswirth W., Laipis P. Transmission genetics of mammalian mitochondrial: a molecular model and experimental evidence // *Archiv. and Perspect. Mitochondrial Res.* 1985. V. 2. P. 49-59.

Hayashi J.-L., Tagashira Y., Yoshida M.C. Absence of extensive recombination between inter- and intraspecies mitochondrial DNA in mammalian cells // *Exp. Cell Res.* 1985. V. 160. P. 387-395.

Henning W., Walker P.M.B. Variation in the DNA from two rodent families (Cricetidae, Muridae) // *Nature*. 1970. V. 225. P. 915-919.

Hirning U., Schultz W.A., Just W. et al. A comparative study of the heterochromatin of *Apodemus sylvaticus* and *Apodemus flavicollis* // *Chromosoma*. 1989. V. 98. P. 450-455.

Hosoda T., Suzuki H., Yamada T., Tsuchiya K. Restriction site polymorphism in the ribosomal DNA of eight species of Canidae and Mustelidae // *Cytologia*. 1993. V. 58. P. 223-230.

Hosoda T., Suzuki H., Tsuchiya K., Kryukov A. Phylogenetic relationships among the Mustelidae on rDNA and mtDNA // *Population, evolutionary and*

ecological genetics of animal species: Proc. Intern. Symp. Russia. Vladivostok, 1995. P. 6.

Hosoda T., Suzuki H., Tsuchiya K et al. Phylogenetic relationships among the genus // *Martes: Taxonomy, Ecology, Techniques and Management* / Eds G. Proulx, H.N. Bryant, P.M. Woodard. Edmonton: The Provincial Museum of Alberta, 1997. P. 3-14.

Hosoda T., Suzuki H., Iwasa M.A. et al. Genetic relationships within and between the Japanese marten *Martes melampus* and the sable *M. zibellina*, based on variation of mitochondrial DNA and nuclear ribosomal DNA // *Mammal study*. 1999. V. 24. P. 25-33.

Hsu T.S. A possible function of constitutive heterochromatin: The body guard hypothesis // *Genetics*. 1975. V. 79. P. 137-150.

Irwin D.M., Kocher T.O., Wilson A.C. Evolution of the cytochrome *b* gene of mammals // *J. Mol. Evol.* 1991. V. 32. P. 128-144.

Iwasa M.A., Utsumi G, Nakata K et al. Geographic patterns of cytochrome *b* and Sry gene lineages in gray red-backed vole, *Clethrionomys rufocanus* (Mammalia, Rodentia) from Far East Asia including Sakhalin and Hokkaido // *Zool. Sci.* 2000. V. 17. P. 477-484.

Jacobs L.J., Downs W.R. The evolution of murine rodents in Asia // *Rodent and Lagomorph Families of Asian Origins and Diversification* / Eds Y. Tomida, C.K. Li, 1994. P. 149-156.

Jeffreys A.J., Wilson V., Thein S.L. Hypervariable minisatellite region in human DNA // *Nature*. 1985. V. 314. P. 67-73.

Johnson K.P., Sorenson M.D. Comparing molecular evolution in two mitochondrial protein coding genes (cytochrome *b* and ND2) in the dabbling ducks (Trbe: Anatini) // *Molecular Phylogenetic and Evolution*. 1998. V. 10, N 1. P. 82-94.

Jones R.N., Rees H. B-chromosomes. L.; N.Y. etc.: Acad Press., 1982. 266 p.

Kawamura Y. Quarternary rodent faunas in the Japanese Islands. Pt 2 // *Mem. Faculty Sci. Kyoto Univ. Geol. Mineral.* 1989. V. 54. P. 1-235.

Kessler L. G, Aviso J. C, Daniel J. W. Magnitude of mtDNA differentiation among vertebrate congeners // *Gentlies. USA.* 1983. V. 104. Suppl. 41.

Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences // *J. Mol. Evol.* 1980. V. 16. P. 111-120.

Kishino H, Hasegawa M. Estimation of the maximum likelihood estimate of the evolutionary tree topologies from DNA sequence data, and the branching order in Hominoidea // *J. Mol. Evol.* 1989. V. 29. P. 170-179.

Kit S. Equilibrium sedimentation in density gradients of DNA preparations from animal tissues // *J. Mol. Biol.* 1961. V. 3. P. 711-715.

Kocher T.O., Thomas W.K, Meyer A. et al. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989. V. 86. P. 6196-6200.

Koh H.S. Geographic variation of morphometry characters among three subspecies of striped field mice *Apodemus agrarius* Pallas (Muridae, Rodentia) from Korea // Korean J. Zool. 1986. V. 29. P. 272-282.

Koh H.S. Systematic studies of Korean rodents. III. Morphometric and chromosomal analyses of striped field mice *Apodemus agrarius chejuensis* Janes and Johnson from Cheju-Do // Korean J. Syst. Zool. 1987. V. 3. P. 24-40.

Koh H.S. Multivariate analysis with morphometric characters of samples representing eight subspecies of striped mice *Apodemus agrarius* Pallas (Rodentia, Mammalia) in Asia: the taxonomic status of subspecies *chejuensis* at Cheju Island, Korea // Korean J. Syst. Zool. 1991.V. 7. P. 179-188.

Koh H.S., Yoo B.S. Variation of mitochondrial DNA in two subspecies of striped field mice *Apodemus agrarius corea* and *Apodemus agrarius chejuensis* from Korea // Korean J. Zool. 1992. V. 35. P. 332-338.

Koh H.S., Yoo S.K., Kim S.B., Yoo B.S. Variation of mitochondrial DNA in two subspecies of striped field mice *Apodemus agrarius corea* Thomas (Mammalia, Rodentia), from the Korean Peninsula // Korean J. Syst. Zool. 1993. V. 9. P. 171-179.

Koh H.S., Lee W-J., Kocher T.D. The genetic relationships of two subspecies of striped field mice, *Apodemus agrarius coreae* and *Apodemus agrarius chejuensis* // Heredity. 2000. V. 85. P. 30-36.

Kondo R., Satta Y., Matsuura E.T. et al. Incomplete maternal transmission of mitochondrial DNA in *Drosophila* // Genetics. 1990. V. 126. P. 657-663.

Kumar S., Hedges S.B. A molecular time scale for vertebrate evolution // Nature. 1998. V. 392. P. 917-919.

Kurland C.G. Evolution of mitochondrial genomes and the genetic code // Biol. Essays. 1992. V. 14. P. 709-714.

Lansman R.A., Avise A.C., Aquadro C.F. et al. Extensive genetic variation in mitochondrial DNA among geographic population of the deer mouse *Peromyscus maniculatus* // Evolution. 1983. V. 37. P. 1—16.

Lara M.C., Patton J.L., Da Silva M.N.F. The simultaneous diversification of South American echimyid rodents (Hystricognathi) based on complete cytochrome *b* sequences // Mol. Phylogenet. Evol. 1996. V. 5. P. 403-413.

Lessa E.P., Cook J.A. The molecular phylogenetic of Tuco-Tucos (genus *Ctenomys*, Rodentia: Octodontidae) suggests an early burst of speciation // Mol. Phylogenet. Evol. 1998. V. 9. P. 88-99.

Lima-de-Faria A., Isaksson M., Olsson E., Essen-Moller J. Cleavage with restriction enzymes of DNA from 39 species of plants and animals // Biochem. Biol. Chem. 1981. P. 173-175.

Lima-de-Faria A., Amason U., Widegren B. et al. Conservation of repetitive DNA sequences in deer species studied by Southern blot transfer // J. Mol. Evol. 1984. V. 20, N 1. P. 17-24.

MacGregor H.C., Sessions S.K. The biological significance of variation in satellite DNA and heterochromatin in newt of the genus *Triturus* in evolutionary perspective // Philos. Trans. Roy. Soc. London. 1986. V B312. P. 243.

Makova K.D., Nekrutenko A., Baker R.J. Evolution of microsatellite alleles in four species of mice (genus *Apodemus*) // J. Mol. Evol. 2000. V. 51. P. 166-172.

Martin Y, Gerlach G, Schlotterer C, Meyer A. Molecular phylogeny of European Muroid rodents based on complete cytochrome *b* sequences // Mol. Phylog. Evol. 2000. V.16. P. 37-47.

Masuda R., Yoshida M.C. A molecular phylogeny of the family Mustelidae (Mammalia, Carnivora), based on comparison of mitochondrial cytochrome *b* nucleotide sequences // Zool. Sci. 1994a. V. 11. P. 605-612.

Masuda R., Yoshida M.C. Nucleotide sequence variation of cytochrome *b* genes in three species of weasels, *Mustela itatsi*, *Mustela sibirica*, and *Mustela nivalis*, detected by improved PCR product direct sequencing technique // J. Mamm. Soc. Japan. 1994b. V. 19. P. 33-43.

Masuda R., Yoshida M.C., Shinyashiki F., Bandu G. Molecular phylogenetic status of the Iriomote cat *Felis iriomotensis*, inferred from mitochondrial DNA sequence analysis // Zool. Sci. 1994. V. 11. P. 597-604.

Masuda R., Yoshida M.C. Two Japanese wildcats, the Tsushima cat and Iriomote cat, show the same mitochondrial DNA lineage as the leopard cat *Felis bengalensis* // Zool. Sci. 1995. V. 12, N 5. P. 655-659.

McReynolds L.A., Deslmones S.M., Williams S.A. Cloning and comparison of repeated DNA sequences from human filaria parasite *Brugia malayi* and animal parasite *Brugia pahangi* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. P. 797-801.

Meyer A., Kocher T.O., Basasihwaki P., Wilson A.C. Monophyletic origin of Lake Victoria cichlid fishes suggested by mitochondrial DNA sequences // Nature. 1990. V. 347. P. 550-553.

Michaux J.R., Filippucci R.M., Libois R. et al. Biogeography and taxonomy of *Apodemus sylvaticus* (the wood mouse) in the Tyrrhenian region: enzymatic variations and mitochondrial DNA restriction pattern analysis // Heredity. 1996. V. 76. P. 267-277.

Michaux J.R., Aguilar J.P., Montuire S. et al. les Murinae (Rodentia, Mammalia) neogenes du Sud de la France: evolution et paleoenvironments // Geobios. 1997. V. 20. P. 379-385.

Michaux J.R., Sara M., Libois R.M., Matagne R. Is the wood mouse (*Apodemus sylvaticus*) of Sicily really a «separate» species? // Belgian J. Zool. 1998a. V. 128. P. 211-214.

Michaux J.R., Libois R., Ramalhinho M.G., Maurois C. On the mtDNA restriction patterns variation of the iberian wood mouse (*Apodemus sylvaticus*) comparison with other west Mediterranean populations // Hereditas. 1998b. V. 129. P. 187-194.

Michaux J.R., Catzeflis F. The bushlike radiation of Muroid rodents is exemplified by the molecular phylogeny of the LCAT nuclear gene // Mol. Phylogen. Evol. 2000. V. 17. P. 280-293.

Michaux J.R., Kinet S., Filippucci M.G., Libois R.M., Besnard A., Catzeflis F. Molecular identification of three sympatric species of wood mice (*Apodemus*

sylvaticus, *A. flavicollis*, *A. alpicolci*) in western Europe (Muridae, Rodentia) // Mol. Ecol. Notes. 2001. V. 1. P. 260-263.

Michaux J.R., Chevret P., Filippucci M.-G., Macholan M. 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. 2002. V. 23. P. 123-136.

Mielke H. W. Patterns of Life: Biogeography of a Changing Word. Boston: Unwin Hyman, 1989.

Miklos G.L.G., Willcocks DA., Baverstock P.R. Restriction endonuclease and molecular analyses of three rat genomes with special reference to chromosome rearrangement and speciation problems // Chromosome (Berl.). 1980. V. 76. P. 339-363.

Mindell D.P., Sorenson M.D., Haddleston C.J. et al. Phylogenetic relationships among and within select avian orders based on mitochondrial DNA // Avian molecular evolution and systematics / Ed. D.P. Mindell. San Diego; London; Boston; N.Y.; Tokyo; Toronto, 1997. P. 213-247.

Mullis K., Falaona F., Scharf S. et al. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction // Cold. Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1986. V. 51. P. 263-273.

Moritz C, Brown W. M. Tandem duplication of D-loop and ribosomal RNA-sequences in lizard mitochondrial DNA // Science. 1986. V. 223, N 4771. V. 1425-1427.

Moritz C, Dowling T.E., Brown W.M. Evolution of animal mitochondrial DNA: Relevance for population biology and systematics // Ann. Rev. Ecol. Syst. 1987. V. 18. P. 269-292.

Musser G.G., Carleton M.D. Famili Muridae // Mammalian species of the world. A taxonomic and geographic reference / Eds D. Wilson, D. Reeder. 2d ed. Wash.: Smiths. Inst. Press, 1993. P. 501-756.

Musser G.G., Brothers E.M., Carleton M.D., Hutterer R. Taxonomy and distributional records of Oriental and European *Apodemus*, with a review of the *Apodemus* - *Sylvaemus* problem // Bonn. Zool. Beitr. 1996. V. 46. P. 143-156.

Nadjafova R.S., Bulatova N.Sh., Chasovlikarova Z., Gerassimov S. Karyological differences between two *Apodemus* species in Bulgaria // Z. Säugetierkunde. 1993. V. 58. P. 232-239.

Nazarenko A.A. Recent history of the East Palaearctic avifauna: transzonal interchange of the forest elements between South and North Asia since the last 35 000 years // Proc. Int. 100th Meeting, Current Topics. Avian. Biol. Bonn. 1990. P. 81-87.

Nei M. Genetic distance between populations // Amer. Naturalist. 1972. V. 106. P. 283-292.

Nei M., Li W.-H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1979. V. 76, N 10. P. 5269-5273.

Nishioka T. Genome comparison in the genus *Mus*. A study with BI, MIF (mouse interspersed fragment) centromeric and Y-chromosomal repetitive sequences // *Cytogenet and Cell Genet.* 1989. V. 50, N 4. P. 195-200.

O'Brien S.J. A role for molecular genetics in biological conservation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994. V. 91. P. 5748-5755.

O'Brien S.J., Martenson J.S., Miththapala S. et al. Conservation genetics of the Felidae // *Conservation genetics: case histories from nature* / Eds J.C. Avise, J.L. Hamrick. N.Y.: Chapman and Hall, 1996. P. 50-74.

Olivo P.D., Vande N.M.J., Laipis J., Hauswirth W.W. Nucleotide sequence evidence for rapid genotypic shifts in the bovine mitochondrial DNA D-loop // *Nature.* 1983. V. 306, N 5941. P. 4011-4012.

Orgel L.E., Crick F.N. Selfish DNA: The ultimate parasite // *Nature* (London). 1980. V. 284, N 5757. P. 604-607.

Ojala D., Montoya J., Attardi G. tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria // *Nature* (London). 1981. V. 290. P. 470-474.

Orlov V.N., Bulatova N.Sh., Nadjafova R.S. et al. Evolutionary classification of European wood mice of the subgenus *Sylvaemus* based on allozyme and chromosome data // *Bonn. Zool. Beitr.* 1996. V. 46. P. 191-202.

Palumbi S.R. Nucleic acids II: The polymerase chain reaction // *Molecular systematics.* 1997. P. 205-226.

Pavlenko M. V. Genetic differentiation and taxonomy of wood mice (Rodentia, Muridae, *Apodemus*) of Eastern Palaearctic // *Population, evolutionary and ecological genetics of animal species: Proc. Intern. Symp. Russia. Vladivostok, 1995.* P. 16.

Pietras D.F., Bennett K.L., Siracusa L.D. et al. Construction of a small *Mus musculus* repetitive DNA library; identification of a new satellite sequence in *Mus musculus* // *Nucl. Acids Res.* 1983. V. 11. P. 6965-6983.

Posada D., Crandell K.A. Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks // *Trends Ecol. Evol.* 1998. V. 16. P. 37-45.

Quinn T. W. Molecular evolution of the mitochondrial genome // *Avian molecular evolution and systematics* / Eds D.P. Mindell. San Diego; L.; Boston; N.Y.; Tokyo; Toronto: Acad. Press, 1997. P. 4-29.

Richardson K.K., Croaby R.M., Good F.J. et al. Bovine DNA contains a single major family of interspersed repetitive sequences // *Eur. J. Biochem.* 1986. V. 154. P. 349-354.

Robinson M., Catzeflis F., Briolay J., Mouchiroud D. Molecular phylogeny of rodents, with special emphasis on murids: Evidence from nuclear gene LCAT // *Mol. Phylogen. Evol.* 1997. V. 8. P. 423-434.

Robinson M., Gouy M., Gautier C., Mouchiroud D. Sensitivity of the relative-rate test to taxonomic sampling // *Mol. Biol. Evol.* 1998. V. 15. P. 1091-1098.

Saiki R.K., Gelfant D.H., Stoffel S. et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase // *Science.* 1988. V. 239. P. 487-491.

Saitoh M., Matsuoka N., Obara Y. Biochemical systematics of three species of the Japanese long-tailed field mice *Apodemus speciosus*, *A. goliacus* and *A. argenteus* // Zool. Science. 1989. V. 6. P. 1005-1018.

Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees // Mol. Biol. Evol. 1987. V. 4. P. 406-425.

Salsler W., Bowen B., Brawn D. et al. Investigation of organisation of mammalian chromosomes at DNA sequence level // Fed. Proc. 1976. V. 35. P. 23-35.

Serizawa K., Suzuki H., Tsuchiya K.A. Phylogenetic view on species radiation in *Apodemus* inferred from variation of nuclear and mitochondrial genes // Biochem. Genet. 2000. V. 38. P. 27-40.

Serizawa K., Suzuki H., Iwasa M.A., Chelomina G.N. et al. Spatio-temporal aspects on mitochondrial DNA genealogy in *Apodemus peninsulae* from East Asia // Biochem. Genet. 2002. V. 40. N 5/6. P. 149-161.

Shields G.F., Wilson A.C. Calibration of mitochondrial DNA evolution in gees // J. Mol. Evol. 1987. V. 24. P. 212-217.

Singer M.F., Thayer R.F., Grimaldi G. et al. Homology between the KpnI and BamHI rodent families of long interspersed repeated sequences // Nucl. Acids. Res. 1983. V. 11. P. 3739-3745.

Sneath P.H.A., Sokal R.R. Numerical taxonomy. San Francisco: W.H. Freeman, 1973. 573 p.

Spiridonova L.N., Chelomina G.N., Kryukov A. P. Some peculiarities of genetic diversity among birds of Corvidae family: data of RAPD—PCR analysis // Proc. Intern. Conf. «Biodiversity and dynamics ecosystems in North Eurasia». 2000. V. 1. P. 79-80.

Springer M.S., Cleven G.C., Madsen O. et al. Endemic African mammals shake the phylogenetic tree // Nature. 1997. V. 388. P. 61-64.

Stanhope M.J., Czelusniak J., Si J.-S. et al. A molecular perspective on mammalian evolution from the gene encoding interphotoreceptor retinoid binding protein, with convincing evidence for bat monophyly // Mol. Phylogenet. 1992. V. 1. P. 148-161.

Stanhope M.J., Smith M.R., Waddell V.G. et al. Mammalian evolution and the interphotoreceptor retinoid binding protein (IRBP) gene: Convincing evidence for several superordinal clades // J. Mol. Evol. 1996. V. 43. P. 83-92.

Suarez E., Mein P. Revision of the genera *Parapodemus*, *Apodemus*, *Rhagamys* and *Rhagapodemus* (Rodentia, Mammalia) // Geobios. 1998. V. 31. P. 87-92.

Summer A. T. A sample technique for demonstrating centromeric heterochromatin // Exptl Cell. Res. 1972. V. 75. P. 304-306.

Suzuki H., Tsuchiya K., Sakaizumi M. et al. Differentiation of restriction sites in ribosomal DNA in the genus *Apodemus* // Biochem. Genet. 1990. V. 28, N 3/4. P. 137-149.

Suzuki H., Tsuchiya K., Sakaizumi M., Wakana S., Sakurai S. Evolution of restriction sites of ribosomal DNA in natural populations of the field mouse, *Apodemus speciosus* // J. Mol. Evol. 1994. V. 38. P. 107-112.

Suzuki H., Wakana S., Yonekawa H. et al. Variations in ribosomal DNA and mitochondrial DNA among chromosomal species of subterranean mole rats // Mol. Biol. Evol. 1996. V. 13. N 1. P. 85-92.

Suzuki H., Iwasa M., Harada M. et al. Molecular phylogeny of red-black voles in Far East Asia based on variation in ribosomal and mitochondrial DNA // J. Mamm. 1999. V. 80. P. 512-521.

Suzuki H., Tsuchiya K., Takezaki N. A molecular phylogenetic framework for the Ryukyu endemic rodents *Tokudaia osimensis* and *Diplotrix legata* // Mol. Phylogen. Evol. 2000. V. 15. P. 15-24.

Tanai T. Tertiary climatic and vegetational changes in the Northern Hemisphere // J. Geogr. 1991. V. 100. P. 951.

Tanic N., Dedovic N., Vujosevic M., Dimitrijevic B. DNA profiling of B chromosomes from the yellow-necked mouse *Apodemus flavicollis* (Rodentia, Mammalia) // Genome Research. 2000. V. 10. P. 55-61.

Tegelstrom H. Transfer of mitochondrial DNA from the northern red-black vole (*Clethrionomys rutilus*) to the bank vole (*C. glareolus*) // J. Mol. Evol. 1987. V. 24. P. 218-227.

Tegelstrom H., Wyoni P.I., Gelter H., Jaarola M. Concordant divergence in proteins and mitochondrial DNA between two vole species in the genus *Clethrionomys* // Biochem. Genet. 1988. V. 26. P. 223-237.

Tegelstrom H., Jaarola M. Genetic divergence in mtDNA between the wood mouse (*Apodemus sylvaticus*) and yellow necked mouse (*A. flavicollis*) // Hereditas. 1989. V. 111. P. 49-60.

Tsuchiya K., Moriwaki K., Yosida T.H. Cytogenetical survey in wild population of Japanese wood mouse, *Apodemus speciosus* and its breeding // Exp. Animals. 1973. V. 22. P. 221-229.

Tsuda K., Kikkawa Y., Yonekawa H., Tanabe Y. Extensive interbreeding occurred among multiple matriarchal ancestors during the domestication of dogs: Evidence from inter- and intraspecies polymorphisms in the D-loop region of mitochondrial DNA between dogs and wolves // Genes Genet. Syst. 1997. V. 72. P. 229-238.

Tsukada M. Map of the vegetation during the last Glacial maximum in Japan // Quatern. Res. 1985. V. 23. P. 369-381.

Upholt W.B., Dawid L.B. Mapping of mitochondrial DNA of individual DNA sheep and goats: rapid evolution in the D-loop region // Cell. 1977. V. 11. P. 571-583.

Varley J.M., Mcgregor H.C., Barnett L. Characterization of a short highly repeated and centromerically localized DNA sequences in the crested and marbled newts of the genus *Triturus* // Chromosoma. 1990. V. 100. P. 15-31.

Vawter L., Brown W.M. Nuclear and mitochondrial DNA comparisons reveal extreme rate variation in the molecular clock // Science. 1986. V. 234, N 4773. P. 194-196.

Vignali R., Rijili P.M., Batistoni R. et al. The dispersed highly repeated DNA families of *Triturus vulgaris meridionales* (Amphibia, Urodela) are widely conserved among Salamandridae // Chromosoma. 1991. V. 100. P. 87-96.

Vogel P., Maddalena T., Mahille A., Paquet G. Biochemical confirmation that the alpine mouse is a distinct species: *Apodemus alpicola* Heinrich, 1952 (Mammalia, Rodentia) // Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat. 1991. V. 80, N 4. P. 471-481.

Vujosevic M. B-chromosomes in mammals // Genetica. 1993. V. 25. P. 247-258.

Vujosevic M., Blagojevic J. Seasonal changes of B-chromosome frequencies within the population of *Apodemus flavicollis* (Rodentia) on Cer mountain in Yugoslavia // Acta Theriologica. 1995. V. 40. P. 131-137.

Wakana S., Sakaizumi M., Tsuchiya K., Asakawa M., Han S.H., Nakata K., Suzuki H. Phylogenetic implications of variations in rDNA and mtDNA in red-black voles collected in Hokkaido, Japan, and in Korea // Mammal Study. 1996. V. 21. P. 15-25.

Walker P.M.B. Repetitive DNA in higher organisms // Biophys. Mol. Biol. 1987. V. 23. P. 145-190.

Wayne R.K., Jenks S.M. Mitochondrial DNA analysis implying extensive hybridization of the endangered red wolf *Cams rufus* // Nature. 1991. V. 351. P. 565-568.

White M.J.D. Models of speciation // Science. 1968. V. 159. P. 1065-1070.

White F.A., Bunn C.L. Segregation of mitochondrial DNA in human somatic cell hybrid // Mol. Gen. Genet. 1984. V. 197. P. 453-460.

Williams I.S.K., Kubelik A.R., Livak K.I. et al. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers // Nucl. Acids Res. 1990. V. 18. P. 6531-6535..

Willis K.J., Kleczkowski A., Crowhurst S.J. 124,000-year periodicity in terrestrial vegetation change during the late Pliocene epoch // Nature. 1999. V. 397. P. 685.

Wilson C.C., Bernatchez L. The ghost of hybrid past: fixation of Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) mitochondrial DNA in introgressed population of lake trout (*S. namaycush*) // Mol. Ecol. 1998. V. 7. P. 127-132.

Witney F.R., Furano A.V. The independent evolution of two closely related satellite DNA elements in rats (*Rattus*) // Nucl. Acids Res. 1983. V. 11, N 2. P. 291-304.

Wright J.W., Spolsky C, Brown W.M. The origin of the parthenogenetic lizard *Cnemidophorus larvduenis* inferred from mitochondrial DNA analysis // Herpetologica. 1983. V. 39. P. 410-416.

Yonekawa #., Moriwaki K., Gotoh O. et al. Evolutionary relationships among five subspecies of *Mus musculus* based on restriction enzyme cleavage patterns on mitochondrial DNA // Genetics. 1981. V. 98. P. 811-816.

Yoshida M.C, Sasaki M., Oshimura M. Karyotype and heterochromatin pattern of field mouse *Apodemus argenteus* Temmink // Genetics. 1975. V. 45. P. 397-803.

Zima J Chromosomes of certain small mammals from southern Bohemia and the Sunava mts. (CSSR) // Folia. Zool. (Bmo). 1984. V. 33. P. 133-141.

Zimmermann K. Sind Gelbmaus und Waldmaus miteinander kreuzbar? // Z. Säugetierkd. 1957. V. 22. P. 214-217.

Оглавление

| | |
|---|------------|
| Предисловие..... | 5 |
| Введение..... | 8 |
| Глава 1. МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭВОЛЮЦИЯ, ФИЛОГЕНИЯ И СИСТЕМАТИКА ПО ДАННЫМ ПОЛИМОРФИЗМА ДЛИН РЕСТРИКЦИОННЫХ ФРАГМЕНТОВ СУММАРНОЙ яДНК..... | 11 |
| 1.1. Дивергенция двух семейств повторяющейся ДНК..... | 17 |
| 1.2. Молекулярно-генетическое типирование трех представителей транспалеарктических лесных мышей..... | 27 |
| 1.3. «Mus»- <i>-mn</i> сегментации сатДНК малой японской мыши <i>Apodemus argenteus</i> | 32 |
| 1.4. Дифференциация GC-богатых сайтов рестрикции в часто повторяющейся ДНК..... | 39 |
| 1.5. Особенности рестрикционного полиморфизма ДНК европейских и азиатских видов..... | 46 |
| 1.6. Генетическая дифференциация лесных мышей Кавказа..... | 54 |
| 1.7. Молекулярная филогения лесных и полевых мышей по данным рестрикционного анализа суммарной яДНК..... | 64 |
| 1.8. Гипотетическая схема организации и эволюции сатДНК мышевидных грызунов..... | 74 |
| Глава 2. МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭВОЛЮЦИЯ, ФИЛОГЕНИЯ И СИСТЕМАТИКА ПО ДАННЫМ ВАРИАбельНОСТИ КОДИРУЮЩИХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ДНК ЯДЕРНОГО И ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО ГЕНОМОВ..... | 88 |
| 2.1. Филогенетические реконструкции по данным дифференциации рестрикционных сайтов в генах рРНК..... | 92 |
| 2.2. Матриархальные связи лесных и полевых мышей по данным секвенирования участка гена цитохрома <i>b</i> мтДНК..... | 96 |
| 2.3. Филогенетические связи и видовая радиация представителей родов <i>Sylvaemus</i> и <i>Apodemus</i> по данным двух белок-кодирующих генов (IRBP яДНК, сyt <i>b</i> мтДНК)..... | 110 |
| 2.4. Молекулярная эволюция и фитогеография западнопалеарктических лесных мышей рода <i>Sylvaemus</i> | 113 |
| Глава 3. ВНУТРИВИДОВАЯ ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ И ФИЛОГЕОГРАФИЯ..... | 137 |
| 3.1. Пространственно-временная генеалогия мтДНК восточноазиатской лесной мыши <i>Apodemus peninsulae</i> | 139 |
| 3.2. Генетическая дифференциация островных разнохромосомных популяций японской красной мыши <i>Apodemus speciosus</i> | 147 |
| 3.3. Генетические взаимоотношения между двумя подвидами полевой мыши <i>Apodemus agrarius</i> Корейского полуострова..... | 151 |
| 3.4. Генетическая дифференциация восточных популяций малой лесной мыши <i>Sylvaemus uralensis</i> | 153 |
| Заключение..... | 164 |
| Список терминов..... | 174 |
| Список сокращений..... | 181 |
| Литература..... | 182 |

Contents

| | |
|---|------------|
| Preface..... | 5 |
| Introduction..... | 8 |
| Chapter 1. MOLECULAR EVOLUTION, PHYLOGENY AND SYSTEMATICS | |
| BASED ON TOTAL nDNA RFLP..... | 11 |
| 1.1. Divergence of two families of repetitive DNA..... | 17 |
| 1.2. Molecular-genetic typing of three transpalearctical wood mice species... | 27 |
| 1.3. «Mus»-type of segmentation of small Japanese field mouse satDNA | 32 |
| 1.4. Differentiation of the GC-rich restriction sites in high repetitive DNA.. | 39 |
| 1.5. Peculiarities of nDNA restriction polymorphism for european and asian species..... | 46 |
| 1.6. Genetic differentiation of three mice from the Caucasus..... | 54 |
| 1.7. Molecular phylogeny of wood and field mice based on total nDNA RFLP..... | 64 |
| 1.8. Hypothetical scheme of organization and evolution of rodent satDNA... | 74 |
| Chapter 2. MOLECULAR EVOLUTION, PHYLOGENY AND SYSTEMATICS | |
| BASED ON CODING DNA SEQUENCES VARIATION..... | 88 |
| 2.1. Phylogenetic reconstructions on the data of restriction sites differentiation in rRNA genes..... | 92 |
| 2.2. Matriarchal relationships of wood mice based on partial sequencing of mtDNA cytochrome <i>b</i> gene..... | 96 |
| 2.3. Phylogenetic relationships and species radiation of the genera <i>Sylvaemus</i> and <i>Apodemus</i> inferred from two protein-coding genes (IRBP of nDNA and cyt <i>b</i> of mtDNA) variation..... | 110 |
| 2.4. Molecular evolution and phylogeography of west-palaearctic wood mice of the genera <i>Sylvaemus</i> on the data of both nuclear and mitochondrial genes..... | 113 |
| Chapter 3. INTRASPECIES GENETICAL DIFFERENTIATION AND PHYLOGEOGRAPHY..... | 137 |
| 3.1. Spatial and temporal geneology of east-asian wood mouse mtDNA <i>Apodemus peninsulae</i> | 139 |
| 3.2. Genetic differentiation of island population of red Japanese field mouse with two different karyomorphs <i>Apodemus speciosus</i> | 147 |
| 3.3. Genetic relationships between two subspecies of striped field mouse <i>Apodemus agrarius</i> from Korean peninsula..... | 151 |
| 3.4. Genetical differentiation of eastern populations of pygmy wood mouse <i>Sylvaemus uralensis</i> | 153 |
| Conclusion..... | 164 |
| List of terms..... | 174 |
| List of abbreviation..... | 181 |
| References..... | 182 |