

Рус. УДК 599.8

*Новые сведения о генетической дифференциации курганчиковой мыши *Mus spicilegus* Petenyi, 1882.*

Мальцев А.Н.¹, Стахеев В.В.², Богданов А.С.³, Панасюк Н.В.², Котенкова Е.В.¹.

¹Институт проблем экологии и эволюции им.А.Н.Северцова РАН;
aleks.maltcev@gmail.com

²Федеральный исследовательский центр Южный научный центр Российской академии наук

³Институт биологии развития им.Н.К. Кольцова РАН

Аннотация:

Получены новые результаты, касающиеся филогенетики и филогеографии курганчиковой мыши *Mus spicilegus* Petenyi, 1882. В настоящее время восточная граница этого вида проходит в России по территории Курской, Белгородской и Ростовской областей. Целями исследования являлись: оценка генетической изменчивости и анализ филогенетических взаимоотношений популяций курганчиковой мыши в наименее изученной в этом отношении восточной части ареала. В результате филогенетического анализа нами установлено, что существует две филогруппы курганчиковых мышей – восточная и западная. В первую входят особи *M. spicilegus* из восточной части ареала (Молдова, Крым, Ростовская область), во вторую – зверьки из центральной и южной Европы (Австрия, Черногория, Сербия, Греция). Ранее был выделен подвид курганчиковых мышей в южной Европе – *M. s. adriaticus*. На филогенетическом дереве в нашей работе данный подвид выделяется в отдельную филогруппу. Первая филогруппа – предковая с Балканского полуострова, отличающаяся более высоким генетическим разнообразием, вторая – распространенная в восточной части ареала, характеризующаяся низкой генетической изменчивостью.

Ключевые слова. *Mus spicilegus*, филогенетика, филогеография, восточная часть ареала

Eng. *New information on the genetic differentiation of the mound-building mouse *Mus spicilegus* Petenyi, 1882.*

Maltsev A.N.¹, Stakheev V.V.², Bogdanov A.S.³, Panasyuk N.V.², Kotenkova E.V.¹

¹*Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia;aleks.maltcev@gmail.com*

²*Federal Research Centre The Southern Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences, Rostov-on-Don, Russia*

³*Koltsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

Abstract:

New results on phylogenetics and phylogeny of the mound-building mouse *Mus spicilegus* Petenyi, 1882 were obtained. The eastern boundary of this species is traced in Russia through the territories of the Kursk, Belgorod and Rostov regions. The objectives of the study: assessment of genetic variability and analysis of phylogenetic relationships between the populations of the mound-building mice in the eastern part of the range, which was insufficiently studied in this respect. As a result of phylogenetic analysis, we found that there are two phylogroups of mound-building mice - eastern and western. The first includes individuals of *M. spicilegus* from the eastern part of the range (Moldova, Crimea, Rostov Region), the second one – animals from central and southern Europe (Austria, Montenegro, Serbia, Greece). Earlier, subspecies of mound-building mice in southern Europe was identified – *M. s. adriaticus*. On the phylogenetic tree in our work, this subspecies is allocated to a separate phylogroup. The first phylogroup is ancestral from the Balkan Peninsula, which has a higher genetic diversity, the second one located in the eastern part of the range, characterized by low genetic variability.

Keywords: *Mus spicilegus*, phylogenetics, phylogeography, eastern part of the range.

Введение

Курганчиковая мышь *M. spicilegus* Petényi, 1882 – степной экзоантропный вид, встречающийся в Австрии, на севере Словакии, юге Болгарии и Украины, в Сербии, Венгрии, Румынии, Молдове и на юге европейской части России [1, 2, 4, 8,11]. Восточная граница современного ареала этого вида проходит по территории Курской, Белгородской и Ростовской областей России. В отдельных местообитаниях, в том числе в агроэкосистемах, курганчиковая мышь составляет значительную долю населения мелких млекопитающих, периодически или время от времени дает вспышки численности. Несмотря на

довольно обширный ареал, в генетическом аспекте вид является слабо изученным.

Отдельные сведения о филогеографии *M. spicilegus*, а также филогенетических взаимоотношениях с близкими видами мы находим в работах М. Махолана с соавт. [9] и Г.П. Митсаинаса с соавт. [10]. Необходимо отметить, что авторами использован незначительный материал и охвачена лишь небольшая часть ареала.

В настоящей работе мы попытались произвести оценку генетической изменчивости курганчиковой мыши и реконструировать филогенетические взаимоотношения популяций этого вида, сделав акцент на восточной, наименее изученной части ареала.

Материал и методика

Материалом для анализа послужили 37 образцов из удаленных частей ареала курганчиковой мыши (табл. 1).

Таблица 1 – Выявленные гаплотипы *M. spicilegus*

Гаплотип	Идентификационный номер	Место сбора
Гаплотип 1 (H1)	EU106320* EU106317* EU106315* EU106314* EU106304* EU106302*	Греция
Гаплотип 2 (H2)	AB039263* K20	Болгария Молдавия
Гаплотип 3 (H3)	U47538* HG421218*	Россия, Крым Молдавия
Гаплотип 4 (H4)	EU106322* EU106321* KR1 KR2 KR3 KR4 KR5 KR6 KR9 K71 K1 Kt35	Молдавия Молдавия Россия, Ростовская обл. Россия, Ростовская обл. Молдавия Молдавия Россия, Крым

	Kr36 Kr37 K14 K16 K17	Россия, Крым Россия, Крым Молдавия Молдавия Молдавия
Гаплотип 5 (H5)	EU106319*	Греция
Гаплотип 6 (H6)	EU106312* EU106301*	Черногория
Гаплотип 7 (H7)	EU106299* U47536* EU106306*	Австрия
Гаплотип 8 (H8)	HG421219*	Молдавия
Гаплотип 9 (H9)	EU106310*	Сербия
Гаплотип 10 (H10)	EU106309* EU106308*	Сербия

Звездочкой отмечены материалы из ГенБанка (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)

Суммарную ДНК выделяли с использованием солевого метода [5] с добавлением протеиназы К. Участок контрольного региона митохондриальной ДНК (D-loop) амплифицировали с использованием пары праймеров: Mtloop3F (5'-CACCACCAGCACCCAAAGCT-3') и Mtloop2R (5'-AGCATTTTCAGTGCTTTGCT-3')[6]. Объем ПЦР смеси составлял 50 мкл и содержал 1,5 мм MgCl₂, 5 pmol каждого праймера, 200 μM dNTP, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 5–10 нанограммов ДНК, и 1,5 единицы TaqDNA полимеразы. Амплификацию проводили с помощью термоциклера Mastercycler-Gradient («Eppendorf») с использованием следующей программы: предварительный прогрев при 94°C 4 мин, 36 циклов по программе 94 °C 40 сек, 58 °C 40 сек и 72 °C 40 сек, амплификация завершилась финальной элонгацией ПЦР-продуктов при 72 °C в течение 15 мин. Полученные ПЦР-продукты анализировали методом гель-электрофореза в 2%-ом агарозном геле в присутствии бромида этидия. Визуализацию и анализ ПЦР-продуктов осуществляли на гель-документирующем устройстве фирмы «Bio-Rad» (Molecular Imager Gel Doc XR System, USA). Очистку ПЦР-продуктов перед проведением второй секвенирующей амплификации проводили с использованием колонок MSB Spin PCRapace («Invitex»).

Выравнивание первичных нуклеотидных последовательностей проводили с использованием программы BioEdit Sequence Alignment Editor версии 7.0.5.3. Длина анализируемого фрагмента составила 532 нуклеотида. Для оценки их различий последовательностей D-loop и расчета генетических дистанций по модели Kimura-2 использовали программный пакет Mega версии 5.1 Дифференциация последовательностей графически отображалась в виде

дендрограммы, построенной по алгоритму “максимального правдоподобия” (ML). Генетическое разнообразие рассчитывали с использованием программы DnaSP version 6.10.00 [12]. Медианная сеть гаплотипов реконструирована в программе Network 5.0.0.1.

Результаты и обсуждение

В результате проведенного анализа было идентифицировано 10 гаплотипов, полиморфными были 11 локусов (табл. 1). Наибольшее генетическое разнообразие отмечено в выборке с территории Сербии и Черногории. В краевых, восточных и западных частях ареала гаплотипическое и нуклеотидное разнообразие были крайне низкими (табл.2).

Таблица 2. Показатели генетического разнообразия популяций курганчиковой мыши

Регион	n	Кол-во полиморфных сайтов	Кол-во гаплотипов	Гаплотипическое разнообразие $h \pm SD$	Нуклеотидное разнообразие $\pi \pm SD$
Вся выборка	39	11	10	0,775±0,062	0,00406±0,00053
Молдова	11	4	4	0,491±0,175	0,00185±0,00129
Ростовская обл.	7	0	1	0	0
Греция	7	1	2	0,286±0,196	0,00054±0,00077
Сербия, Черногория	6	6	4	0,867±0,129	0,00541±0,00202
Австрия	3	0	1	–	–
Крым	4	2	2	–	–

В медианной сети центральное положение занимают гаплотипы *M. spicilegus* с территории Греции (рис.1). Разнонаправлено от центрального гаплотипа расходится ряд ветвей, одна из которых соответствует особям с территории Сербии, вторая, существенно отличающаяся ветвь – зверькам из Черногории, третья, дифференцированная в наибольшей степени – популяциям из Молдовы, Крыма, Ростовской области.

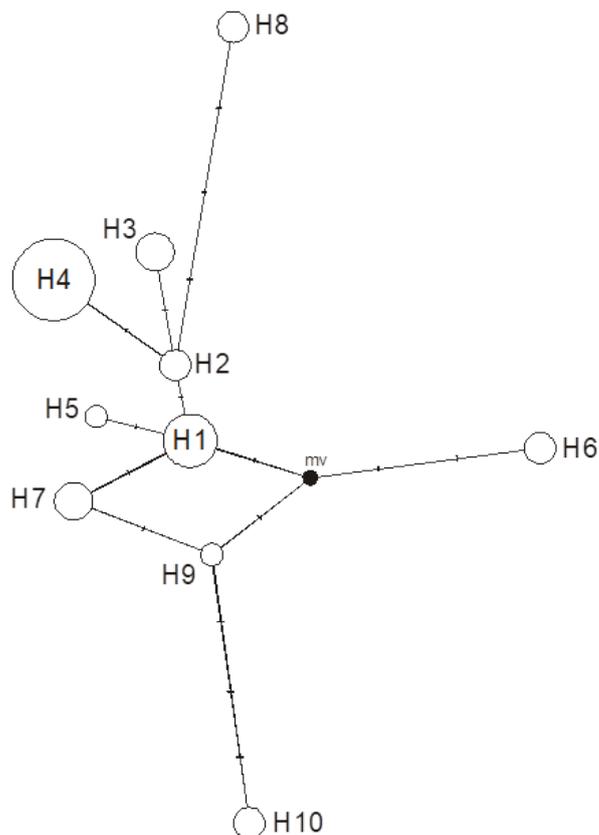


Рис. 1 Медианная сеть гаплотипов изученной выборки *M. spicilegus*

На дендрограмме, построенной методом максимального правдоподобия (ML), структурированность не выражена. Существенно выделяются зверьки с северо-запада ареала – Черногория, Сербия, Австрия (рис. 2). Наиболее значительными дистанциями (1.0–1.2%) отделяются мыши с территории Черногории. Ранее обитающие здесь зверьки по морфологическим признакам были выделены в отдельный подвид *M. spicilegus adriaticus* [7].

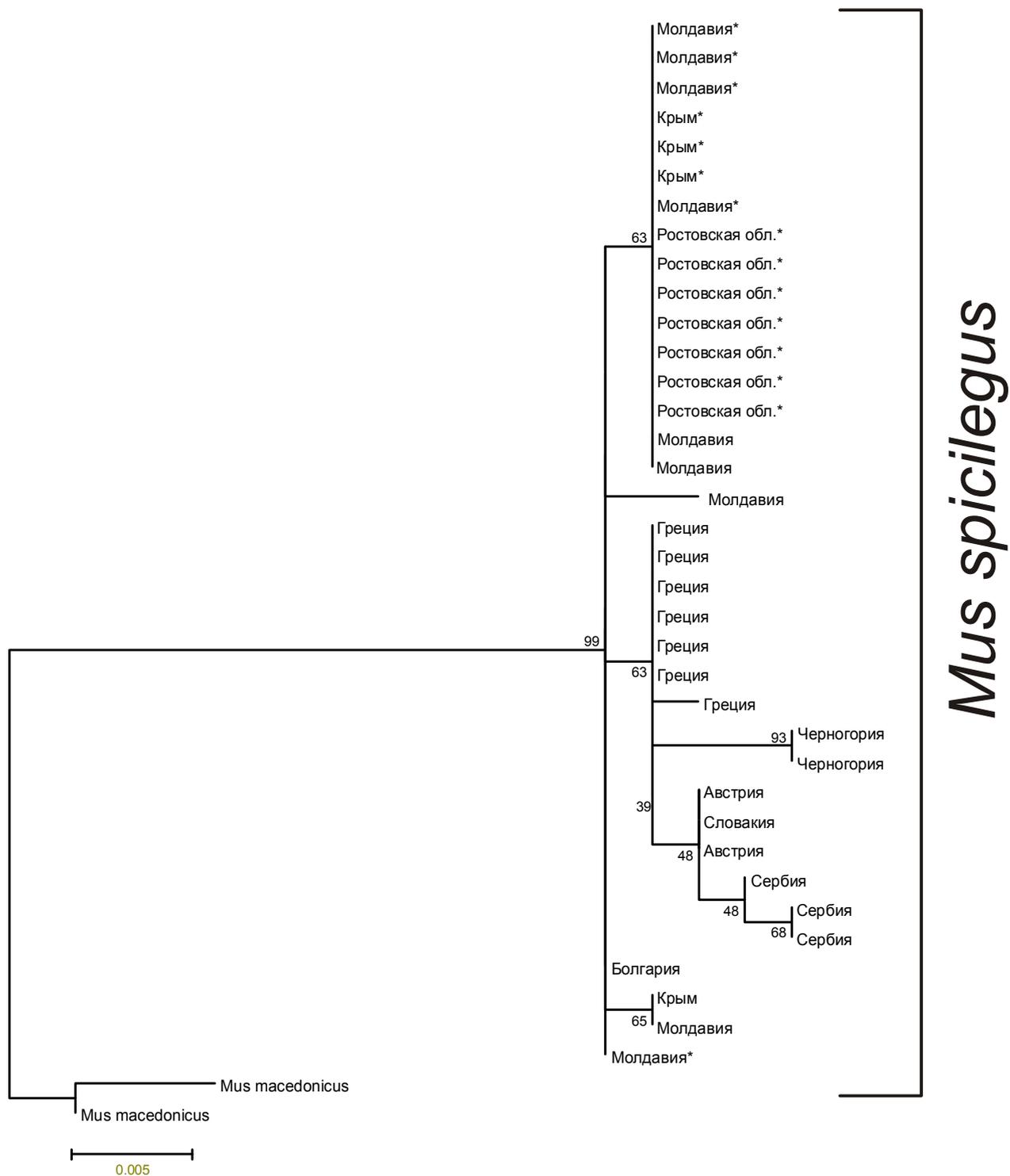


Рис. 2. ML-дендрограмма филогенетических взаимоотношений *M. spicilegus* по данным анализа контрольного региона мтДНК(D-loop) (звездочками обозначены сборы авторов).

Все образцы из восточной части ареала (Молдавия, Крым, Ростовская область) вошли в восточную филогруппу *M. spicilegus*. К западной филогруппе относятся курганчиковые мыши из южной и центральной Европы (рис.2), которые могут принадлежать к подвиду *M. s. adriaticus* [7,10]. Вероятно, такая дифференциация может быть обусловлена расселением курганчиковых мышей в разные периоды времени. Известно, что дивергенция *M. spicilegus* и *M. macedonicus* составляет 0,7 – 1 млн лет [9]. Считается, что расселение курганчиковой мыши происходило экспоненциально в недавнем историческом прошлом [9,10]. Обсуждались два маршрута колонизации Европы предковой формой курганчиковой мыши. Первый – северный коридор – из Индии и Пакистана вдоль северного берега Каспийского и Черного морей, а затем на юг до Балкан, второй – южный путь – через Босфор. Важную роль в распространении *M. spicilegus* в Южной Европе играют ее конкурентные взаимоотношения с другим представителем экзоантропных видов домовых мышей – македонской мышью *Mus macedonicus*, по-видимому, проникшей в Европу позже также через Босфорский пролив.

Полученные нами данные позволяют предположить, что Балканский полуостров является центром расселения предковых популяций курганчиковой мыши в Европе. Далее расселение шло в северо-западном направлении по Среднедунайской равнине и побережью Адриатического моря, и в восточном направлении по Северному Причерноморью. Расселение в восточном направлении произошло в недавнем историческом прошлом достаточно быстро и может быть связано как с развитием сельского хозяйства, так и с определенными климатическими сдвигами, прежде всего гумидизацией. На недавнее и быстрое расселение вида указывает то обстоятельство, что в восточной части ареала курганчиковые мыши оказались более мономорфными. В будущем планируется дополнить материал образцами из других точек восточного участка ареала, что позволит дать более полную картину генетической изменчивости *M. spicilegus*.

Что касается филогенетического анализа, то можно отметить, что в восточной части ареала курганчиковые мыши оказались более мономорфными, что возможно связано с близкородственными скрещиваниями и расселением одной линии по всему краю восточной части ареала. В будущем планируется дополнить материал образцами из других точек восточного ареала, что позволит дать более полную картину генетической изменчивости *M. spicilegus*.

Публикация подготовлена в рамках реализации ПФИ Президиума РАН № 1.41 «Биоразнообразие природных систем и биологические ресурсы России» (ГЗ ЮНЦ РАН на 2018 г., № гр. проекта АААА-А18-118011990326-9)».

Авторы выражают благодарность Н.Н. Товпинцу (Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Крым и городе федерального значения Севастополе) за помощь в сборе материала.

Список литературы

1. Булатова Н. Ш., Ковальская Ю. М. Курганчиковая мышь в России: первое хромосомное доказательство // Вестник ВОГиС. 2004. Т. 8. № 3.– С. 149–150.
2. Липкович А.Д. Курганчиковая мышь (*Mus spicilegus* Petényi, 1882) в Ростовской области // Вестник Южного научного центра РАН. 2005. Т.1. №4.– С. 51–57.
3. Межжерин С. В. Таксономия и современные взгляды на систему домовых мышей Палеарктики // Домовая мышь. Происхождение, распространение, систематика, поведение / Е. В. Котенкова, Н. Ш. Булатова, ред. / М.: Наука. 1994.– С. 15–27.
4. Соколов В. Е., Котенкова Е. В., Лялюхина С.И. Биология домовой и курганчиковой мышей / М.: Наука. 1990.– 207с.
5. Aljanabi S.M. and Martinez, I. Universal and rapid salt extraction of high quality genomic DNA for PCR based techniques // Nucleic Acids Research. 1997. Vol. 25.– P. 4692–4693.
6. Bayona-Bafaluy, M.P., Acin-Perez R., Mullikin J.C., Park J.S., Moreno-Loshuertos R., Hu P., Perez-Martos A., Fernandez-Silva P., Bai Y., Enriquez A., Revisiting the mouse mitochondrial DNA sequence // Nucleic Acids Research 2003, Vol. 31.– P. 5349–5355.
7. Kryštufek B., Macholán M. Morphological differentiation in *Mus spicilegus* and the taxonomic status of mound-building mice from the Adriatic coast of Yugoslavia // Journal of Zoology. 1998. Vol. 245.–P. 185–196.
8. Macholán M. *Mus spicilegus* Petényi, 1882 // In: The Atlas of European Mammals. (eds. Mitchell-Jones AJ, Amori J, Bogdanowicz W et al.).– Academic Press. London 1999b. P. 288–289.
9. Macholán M., Vyskočilová M., Bonhomme F., Kryštufek B., Orth A., Vohralík V. Genetic variation and phylogeography of free-living mouse species (genus *Mus*) in the Balkans and the Middle East // Molecular Ecology. 2007. Vol.– 16. P. 4774–4788.
10. Mitsainas, G. P., Tryfonopoulos G.A., Thanou E.G., Bisa R., Fraguadakis-Tsolis S.E., Chondropoulos B.P. New data on the distribution of *Mus spicilegus* Pe-

tenyi, 1882 (Rodentia, Muridae) and a distinct mtDNA lineage in the southern Balkans // *Mammalian Biology*. 2008. Vol. 74. – P. 351–360.

11. Sokolov V.E., Kotenkova E.V., Mikhailenko A.G. *Mus spicilegus* // *Mammalian Species*. 1998. № 592. – P. 1–6.

12. Rozas J., Ferrer-Mata A., Sánchez-DelBarrio J.C., Guirao-Rico S., Librado P., Ramos-Onsins S.E., Sánchez-Gracia A. DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Datasets // *Molecular Biology and Evolution*. 2017. Vol. 34. – P. 3299–3302.

Spisok literature

1. Bulatova N. Sh., Koval'skaya Yu. M. Kurganchikovaya mysh' v Rossii: pervoe xromosomnoe dokazatel'stvo // *Vestnik VOGiS*. 2004. T. 8. № 3. – S. 149–150.

2. Lipkovich A.D. Kurganchikovaya mysh' (*Mus spicilegus* Petényi, 1882) v Rostovskoj oblasti // *Vestnik Yuzhnogo nauchnogo centra RAN*. 2005. T. 1. № 4. – S. 51–57.

3. Mezhzherin S. V. Taksonomiya i sovremennye vzglyady na sistemu domovyx myshej Palearktiki // *Domovaya mysh'. Proisxozhdenie, rasprostranenie, sistematika, povedenie* / E. V. Kotenkova, N. Sh. Bulatova, red. / M.: Nauka. 1994. – S. 15–27.

4. Sokolov V. E., Kotenkova E. V., Lyalyuxina S.I. *Biologiya domovoj i kurganchikovoj myshej* / M.: Nauka. 1990. – 207s.

5. Aljanabi S.M. and Martinez, I. Universal and rapid salt extraction of high quality genomic DNA for PCR based techniques // *Nucleic Acids Research*. 1997. Vol. 25. – P. 4692–4693.

6. Bayona-Bafaluy, M.P., Acin-Perez R., Mullikin J.C., Park J.S., Moreno-Loshuertos R., Hu P., Perez-Martos A., Fernandez-Silva P., Bai Y., Enriquez A., Revisiting the mouse mitochondrial DNA sequence // *Nucleic Acids Research* 2003, Vol. 31. – P. 5349–5355.

7. Kryštufek B., Macholán M. Morphological differentiation in *Mus spicilegus* and the taxonomic status of mound-building mice from the Adriatic coast of Yugoslavia // *Journal of Zoology*. 1998. Vol. 245. – P. 185–196.

8. Macholán M. *Mus spicilegus* Petényi, 1882 // In: *The Atlas of European Mammals*. (eds Mitchell-Jones AJ, Amori J, Bogdanowicz W et al.). – Academic Press. London 1999b. P. 288–289.

9. Macholán M., Vyskočilová M., Bonhomme F., Kryštufek B., Orth A., Vohralík V. Genetic variation and phylogeography of free-living mouse species (genus *Mus*) in the Balkans and the Middle East // *Molecular Ecology*. 2007. Vol.– 16. P. 4774–4788.
10. Mitsainas, G. P., Tryfonopoulos G.A., Thanou E.G., Bisa R., Fraguedakis-Tsolis S.E., Chondropoulos B.P. New data on the distribution of *Mus spicilegus* Petenyi, 1882 (Rodentia, Muridae) and a distinct mtDNA lineage in the southern Balkans // *Mammalian Biology*. 2008. Vol. 74. – P. 351–360.
11. Sokolov V.E., Kotenkova E.V., Mikhailenko A.G. *Mus spicilegus*. // *Mammalian Species*. 1998. № 592. – P.1–6.
12. Rozas J., Ferrer-Mata A., Sánchez-DelBarrio J.C., Guirao-Rico S., Librado P., Ramos-Onsins S.E., Sánchez-Gracia A. DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Datasets // *Molecular Biology and Evolution*. 2017. Vol. 34. – P. 3299–3302.