

УДК: 575.22: 599.323.4

ВЫЯВЛЕНИЕ НОВЫХ ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИХ ЛИНИЙ У ВОСТОЧНОАЗИАТСКОЙ МЫШИ НА ЮГЕ СИХОТЭ-АЛИНЯ НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА ИЗМЕНЧИВОСТИ ГЕНА ЦИТОХРОМА *b*

© 2024 г. В. Д. Цуканова¹, И. Н. Шереметьева^{1, *}

¹Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии Дальневосточного отделения
Российской академии наук, Владивосток, 690022 Россия

*e-mail: sheremet76@yandex.ru

Поступила в редакцию 21.02.2024 г.

После доработки 18.03.2024 г.

Принята к публикации 19.03.2024 г.

Проведен анализ изменчивости гена цитохрома *b* 11 особей восточноазиатских мышей из Уссурийского заповедника, расположенного на южных отрогах Сихотэ-Алиня в горах Пржевальского. В анализируемой популяции отмечен относительно высокий уровень генетического разнообразия за счет обнаружения особей с гаплотипами трех филогенетических линий: “Amur”, “Korea” и “Manchuria”. Большая часть особей (72.73%) в популяции имела “Amur”-гаплотипы. Отмечено, что частота особей с гаплотипами “Korea” в Уссурийском заповеднике (9.09%) значительно ниже, чем в проанализированной нами ранее популяции на самом юге Приморского края, в Хасанском районе (38.46%). В Уссурийском заповеднике впервые для территории Дальнего Востока России обнаружены две особи с гаплотипами “Manchuria”. Ранее в литературе была отмечена только одна находка особи с подобным гаплотипом в провинции Хэйлуцзян северо-востока Китая. Нами высказано предположение, что особи с гаплотипами “Korea” проникают на юг Сихотэ-Алиня из Южной Кореи, а с гаплотипами “Manchuria” – из Северо-Восточного Китая.

Ключевые слова: внутривидовая изменчивость, филогеография, цитохром *b* мтДНК, восточноазиатская мышь *Apodemus peninsulae*.

DOI: 10.31857/S0016675824090128 **EDN:** ADIPIJ

Восточноазиатская мышь *Apodemus peninsulae* Thomas, 1906 – типичный представитель лесной фауны на юге Дальнего Востока России. Являясь обитателем смешанных и широколиственных лесов, вид распространен от тихоокеанского побережья на востоке, включая острова Русский и Стенина в зал. Петра Великого (Японское море), о-в Сахалин, о-в Хоккайдо (Япония), до Центральной и Южной Сибири (правобережье р. Оби) на западе. По побережью и долинам рек глубоко проникает на север вплоть до Полярного круга. Филогеография этого очень многочисленного и широко распространенного вида ранее изучалась в ряде исследований, в результате которых было показано, что на севере ареала (северо-восток Китая, Корея, Монголия, Япония и Россия) присутствуют три филогенетические линии [1–4]. Две из них имеют широкое распространение, а третья обнаружена только у одной особи из провинции Хэйлуцзян в северо-восточной части Китая [2]. При этом на территории юга Дальнего Востока России была обнаружена только одна из широко распространенных линий, названная нами “Amur” (ранее

“Primorye”) [4]. Следует отметить, что при этом было проанализировано 59 экз. с Дальнего Востока России (32 экз. с островов и 27 – с материка с малым размером выборок). Проведенный анализ восточноазиатских мышей из девяти локальных выборок с юга Корейского п-ова не только подтвердил данные предыдущих исследований [2] о более тесной связи с особями восточнокитайских или сибирских популяций, нежели с дальневосточными популяциями, но и показал отсутствие генетического обмена с соседними популяциями [5]. В дальнейшем при проведении анализа изменчивости участка гена цитохрома *b* у восточноазиатской мыши *A. peninsulae* из популяции Национального парка “Земля леопарда” на самом юге Приморского края нами впервые были обнаружены гаплотипы филогенетической линии “Korea” [6] с достаточно высокой частотой (38.46% – пять из 13 особей).

Таким образом, стало понятно, что распространение особей, имеющих гаплотипы филогенетической линии “Korea”, не ограничивается Корейским п-овом, как считали корейские авторы [5], а исследование небольшого числа очень малочисленных

выборки явно недостаточно для понимания филогенетической структуры восточноазиатской мыши на столь обширной и географически сложной территории. Таким образом, для выявления полной картины генетического разнообразия вида необходимо увеличение не только географии выборок, но и их объема.

Цель настоящего исследования – на примере выборки из популяции Уссурийского заповедника как района экологического оптимума для восточноазиатской мыши охарактеризовать генетическое разнообразие на основе анализа изменчивости гена цитохрома *b*.

В настоящей работе проанализирована изменчивость гена цитохрома *b* у 11 экземпляров восточноазиатских мышей из Уссурийского заповедника, расположенного на южных отрогах Сихотэ-Алиня в горах Пржевальского. Образцы тканей взяты из коллекции УНУ “Биоресурсная коллекция ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН” (г. Владивосток).

ДНК выделяли методом солевой экстракции [7] из фиксированных в спирте тканей мышц. Схемы амплификации и использованные праймеры для получения фрагмента и подготовки проб к секвенированию были описаны ранее [4]. Нуклеотидные последовательности определяли на автоматическом секвенаторе ABI Prizm 3130 (Applied Biosystems, США) на базе ЦКП «Биотехнология и генетическая инженерия» ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН (г. Владивосток). Выравнивание последовательностей проводили с использованием программы BioEdit 7.2.5.0 [8], а построение филогенетических деревьев выполнено в программе MEGA X [9]. При построении деревьев в анализ включены 38 нуклеотидных последовательностей, полученных ранее и помещенных в GenBank (NCBI) под номерами AV073788, AV073790, AV073791, AV073794–AV073798, AV073800–AV073805, AV073808, AV073810 [1], AF427335–AF427338 (Деконенко, Иванов не опуб.), JQ664596, JQ664597 [3], AY388999–AY389000, AY389002 [10], AM945780, AM945797 [2], MG748177, MG748179, MG748193, MG748201, MG748239 [11], KT364353, KT364362, KT364369, KT364378, KT364379 [5].

Для построения деревьев применяли метод максимального правдоподобия (Maximum Likelihood) с использованием эволюционной модели НКУ+I (модель Хасегава–Кишино–Яно) [12] со значением эволюционной нейтральности сайтов, равным 0.80, и максимальным логарифмом правдоподобия – 1875.064. Выбор эволюционной модели ML-анализа определяли по результатам модель-теста в программе MEGA X [9], по которым для модели НКУ+I были получены минимальные значения байесовского информационного критерия (BIC = 4800.783). В качестве внешней группы использованы гаплотипы южных филогенетических

линий вида (AM945797, MG748193 и MG748239), обнаруженные только у особей провинции Сычуань (Китай). Достоверность кластеризации оценивали с помощью бутстрэп-анализа (1000 повторностей). Сети гаплотипов построены при помощи программы Network 10.0.0.0 с использованием метода «Median-Joining» [13].

Для всех 11 новых образцов восточноазиатской мыши были получены последовательности длиной от 746 до 1476 пн, включающие участки гена цитохрома *b* и контрольного региона мтДНК, все они внесены в GenBank (NCBI) под номерами PP488384–PP488394. После выравнивания с гомологичными последовательностями из GenBank (NCBI) полученные последовательности участка гена цитохрома *b* были обрезаны до длины 744 пн. Всего обнаружено девять гаплотипов, из которых восемь были обнаружены впервые. Они содержали 28 переменных сайтов (3.76%), среди которых 18 были информативными. Из обнаруженных гаплотипов два были встречены у двух особей, а остальные семь (77.78%) были уникальными (встречены только у одной особи). Среднее число нуклеотидных различий между гаплотипами составило 8.58. Гаплотипическое разнообразие для выборки равно 0.964 ± 0.051 , а нуклеотидное – 0.01153 ± 0.00309 , что больше, чем было выявлено раньше для Дальнего Востока России (0.942 ± 0.048 и 0.00636 ± 0.00105 соответственно) [2] и Южной Кореи (0.98 ± 0.01 и 0.00844 ± 0.00042 соответственно) [5].

Все новые последовательности на ML-дендрограмме были распределены на три клады, которые соответствуют линиям “Amur”, “Korea” и “Manchuria” (рис. 1, а). Линии “Amur” и “Korea” на дереве сестринские, а линия “Manchuria” расположена базальнее, что указывает на ее большую древность. Большая часть последовательностей (72.73%) попала в кладу “Amur”, одна последовательность (9.09%) – в кладу “Korea”. Стоит отметить, что частота встречаемости особей с гаплотипами “Korea” на самом юге Приморского края в Хасанском районе несколько выше и составляет 38.46% [6]. Два гаплотипа 207-18 и 208-18 сгруппировались вместе с гаплотипом, обнаруженным ранее у особи из провинции Хэйлунцзян северо-востока Китая [2], сформировав кладу “Manchuria”.

С целью проведения более точной кластеризации гаплотипов восточноазиатской мыши была построена медианная сеть (рис. 1, б). В целом сеть подтверждает данные, полученные при ML-анализе, показывая разделение всех вновь исследованных гаплотипов на три линии. Линия “Amur” имела структуру, близкую к звездообразной, формирование которой, как правило, объясняют быстрой экспансией после сокращения численности (“бутылочного горлышка”). Центральный гаплотип этой линии был обнаружен у двух особей (203-18 и

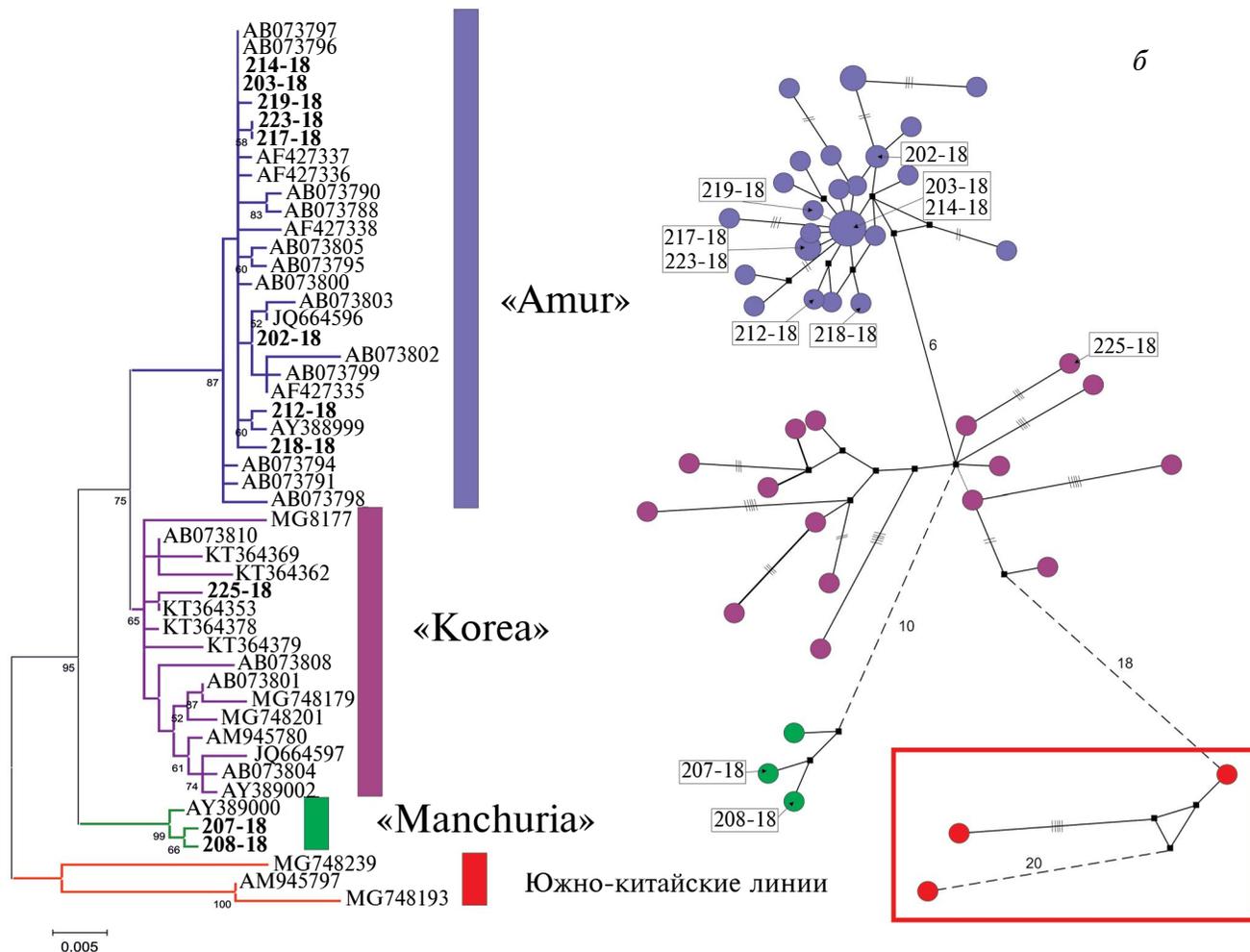


Рис. 1. ML-дендрограмма (а) и филогенетическая сеть гаплотипов цитохрома *b* мтДНК (б) восточноазиатской мыши. В узлах ветвления указаны бутстреп-поддержки, рассчитанные для 1000 повторов. Номера образцов из Уссурийского заповедника обозначены на дереве жирным шрифтом. Размеры кружков пропорциональны количеству образцов с данным гаплотипом. Цифры и риски на ветвях сети соответствуют числу нуклеотидных замен больше двух.

214-18), а все остальные отличались от него на 1–2 нуклеотидные замены.

Линия “Korea” генетически более разнообразна, чем линия “Amur”. Ранее было показано, что внутри этой линии выделяются две подгруппы, которые приурочены к различным географическим регионам [4, 5]. Первая – к Корейскому п-ову, а вторая – к Монголии, Алтаю и Забайкалью. Гаплотип 225-18, обнаруженный в Уссурийском заповеднике, оказался наиболее близок к гаплотипу KT364353 из Южной Кореи (пос. Джинбу в уезде Пхенчхан в провинции Канвондо), отличающийся от него тремя транзюциями. Учитывая тесную связь гаплотипов из Уссурийского заповедника и Южной Кореи, а также снижение частоты встречаемости особей с гаплотипами этой линии от южных (Хасанский р-н) к центральным (Уссурийский

заповедник) районам Приморского края, можно предположить, что происходит расширение линии “Korea” и проникновение ее на север.

Гаплотипы особей, попавшие в кладу “Manchuria” (207-18 и 208-18), отличаются от гаплотипа особи из провинции Хэйлунцзян северо-востока Китая по трем заменам, а друг от друга по двум. Можно предположить, что особи с гаплотипами “Manchuria” проникают на территорию Уссурийского заповедника с северо-востока Китая. Тогда следует ожидать, что частота встречаемости особей с гаплотипами этой группы в западных районах Приморского края должна быть выше. Однако на сегодняшний момент это невозможно оценить, поскольку восточноазиатская мышь из этих районов остается неисследованной.

В результате проведенной работы были получены новые данные по изменчивости участка гена цитохрома *b* мтДНК восточноазиатской мыши *A. peninsulae* в Уссурийском заповеднике, расположенном на южных отрогах Сихотэ-Алиня в горах Пржевальского. Впервые показано обитание в этом районе особей с гаплотипами трех филогенетических линий “Amur”, “Korea” и “Manchuria”. При этом если филогенетическая линия “Korea” раньше уже отмечалась нами на территории края, то линия “Manchuria” обнаружена впервые. Высказано предположение, что особи с гаплотипами филогруппы “Korea” проникают на юг Сихотэ-Алиня из Южной Кореи, а с гаплотипами филогруппы “Manchuria” – из Северо-Восточного Китая.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-24-00158, <https://rscf.ru/project/24-24-00158/>

Исследование одобрено Этическим комитетом ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН (21 февраля 2023 г., протокол № 1).

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Serizawa K., Suzuki H., Iwasa M. et al. A spatial aspect of mitochondrial DNA genealogy in *Apodemus peninsulae* from East Asia // *Biochem. Genet.* 2002. № 40. P. 149–161. doi 10.1023/a:1015841424598
2. Sakka H., Quere J.P., Kartavtseva I.V. et al. Comparative phylogeography of four *Apodemus* species (Mammalia: Rodentia) in the Asian Far East: Evidence of Quaternary climatic changes in their genetic structure // *Biol. J. Linnean Society.* 2010. V. 100. P. 797–821. doi 10.1111/j.1095-8312.2010.01477.x
3. Bayarkhagva D., Tumendemberel O., Damdin B. Mitochondrial cytochrome b gene study of *Apodemus peninsulae* in Mongolia // *Int. J. Curr. Res.* 2013. V. 5. № 12. P. 3892–3896. doi 10.13140/RG.2.2.24365.31200
4. Шереметьева И.Н., Цуканова В.Д., Тимофеева Д.М. и др. Новые данные по распределению основных филогенетических линий восточноазиатской мыши *Apodemus peninsulae* на востоке России // Региональные проблемы. 2020. Т. 23. № 3. С. 10–20. doi 10.31433/2618-9593-2020-23-3-10-20
5. Kim H.R., Park Y.C. Genetic isolation of Korean populations of *Apodemus peninsulae* (Rodentia: Muridae) from their neighboring populations // *Genes & Genomics.* 2015. V. 37. № 12. P. 999–1005. doi 10.1007/s13258-015-0331-0
6. Цуканова В.Д., Шереметьева И.Н., Малыгин В.М. Изменчивость гена *cyt b* у восточноазиатской мыши *Apodemus peninsulae* Thomas, 1906 – природного носителя хантавируса AMRV в Хасанском районе Приморского края // *Амурский зоол. журн.* 2024. № 1. С. 56–64. <https://www.doi.org/10.33910/2686-9519-2024-16-1-56-64>
7. Aljanabi S.M., Martinez I. Universal and rapid salt extraction of high quality genomic DNA for PCRbased techniques // *Nucl. Aci. Res.* 1997. V. 25. № 22. P. 4692–4693. doi: 10.1093/nar/25.22.4692
8. Hall T.A. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98 // *Nucl. Aci. Symp. Series.* 1999. V. 41. № 41. P. 95–98. doi 10.1021/bk-1999-0734.ch008
9. Kumar S., Stecher G., Li M. et al. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms // *Mol. Biol. Evol.* 2018. V. 35. № 6. P. 1547–1549. doi 10.1093/molbev/msy096
10. Liu X., Wei F., Li M. et al. Molecular phylogeny and taxonomy of wood mice (genus *Apodemus* Kaup, 1829) based on complete mtDNA cytochrome b sequences, with emphasis on Chinese species // *Mol. Phylogenet. Evol.* 2004. V. 33. № 1. P. 1–15. doi 10.1016/j.ympev.2004.05.011
11. Liu S.Y., He K., Chen S.D. et al. How many species of *Apodemus* and *Rattus* occur in China? A survey based on mitochondrial *cyt b* and morphological analyses // *Zool. Res.* 2018. V. 39. № 5. P. 309–320. doi 10.24272/j.issn.2095-8137.2018.053
12. Hasegawa M., Kishino H., Yano T. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA // *J. Mol. Evol.* 1985. № 22. P. 160–174. doi 10.1007/BF02101694
13. Bandelt H.J., Forster P., Röhl A. Median-Joining networks for inferring intraspecific phylogenies // *Mol. Biol. Evol.* 1999. V. 16. № 1. P. 37–48. doi 10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036

Detection of New Phylogenetic Lineages in the Korean Field Mouse in the South of Sikhote-Alin Based on Analysis of the Cytochrome *b* Gene Variability

V. D. Tsukanova¹, I. N. Sheremetyeva^{1, *}

¹*Federal Scientific Center of the East Asia Terrestrial Biodiversity, Far East Branch Russia Academy of Sciences, Vladivostok, 690022 Russia*

**e-mail: sheremet76@yandex.ru*

The variability of the cytochrome *b* gene in 11 individuals of Korean field mouse from the Ussuri Nature Reserve, located on the southern spurs of the Sikhote-Alin in the Przewalski Mountains, was analyzed. In the population, a high level of genetic diversity was identified due to the discovery of individuals with haplotypes of three phylogenetic lineages “Amur”, “Korea” and “Manchuria”. The majority of individuals (72.73%) in the population had “Amur” haplotypes. A significantly lower frequency of occurrence of individuals with “Korea” haplotypes in the Ussuri Nature Reserve (9.09%) compared to the previously analyzed population of the Khasansky District (38.46%) located in the very south of the Primorsky Krai was noted. In the Ussuri Nature Reserve, for the first time in the Russian Far East, two individuals with “Manchuria” haplotypes were discovered. Previously, only one finding of an individual with a similar haplotype was noted in the literature in the Heilongjiang province of Northeast China. It has been suggested that individuals with haplotypes of the “Korea” phylogroup penetrate into the south of Sikhote-Alin from South Korea, and with haplotypes of the “Manchuria” phylogroup from Northeast China.

Keywords: intraspecific variability, phylogeography, mtDNA cytochrome *b*, Korean field mouse *Apodemus peninsulae*.