

УДК 557.063.7

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ВЗАИМООТНОШЕНИЯ И ВИДОВОЙ СОСТАВ РОДА *NIVIVENTER* (RODENTIA, MURIDAE) ПО ДАННЫМ ИССЛЕДОВАНИЯ ГЕНА ЦИТОХРОМА *b* мтДНК

А.Е. Балакирев, В.В. Рожнов

(Институт проблем экологии и эволюции имени А.Н. Северцова РАН, г. Москва;
Совместный Российско-Вьетнамский Тропический научно-исследовательский
и технологический центр. Южное отделение, г. Хошимин, Вьетнам;
e-mail: alexbalakirev@mail.ru)

Исследован видовой состав рода *Niviventer*. Подтверждено наличие в составе рода не менее 15 видов, 8 из которых представляют фауну Вьетнама. На основании анализа гена цитохрома *b* мтДНК сделана попытка выделения естественных внутривидовых групп и обсуждены вопросы внутривидовой систематики.

Ключевые слова: *Niviventer*, филогения, внутривидовая систематика.

Основная часть видов рода впервые была описана около столетия назад и долгое время систематика группы оставалась весьма условной и противоречивой. Первоначально представители рода *Niviventer* включались в род *Rattus sensu lato* и были выведены из него Массером и др. [1, 2]. Однако на протяжении более полувека не существовало установившегося мнения относительно видового состава рода и статуса принадлежащих к нему форм [2–5]. В большинстве позднейших обзоров [6–8] принимается структура рода, предложенная Массером [2]. В последней сводке [9] в состав рода включено 17 видов, объединяемых в две группы — *andersoni* и *niviventer*, однако структура внутривидовых отношений для большинства видов рода остается неопределенной. Решить эту проблему возможно при помощи молекулярно-генетических методов. Тем не менее до недавнего времени вышла лишь одна работа, охватывающая значительное количество видов и реализующая такой подход [10]. Целью нашего исследования было обобщение имеющихся на сегодня данных по роду *Niviventer*, их видовая верификация и выявление эволюционных клад.

Материалы и методы

Исследовано 78 новых образцов *Niviventer*, собранных в ходе экспедиций Российско-Вьетнамского Тропического центра (2008–2009 гг.) в различных точках на территории Вьетнама. Это заповедники Нам Кат Тиен (N 11°26'23'', E 107°24'55''), Ло Го Са Мат (N 11°35', E 105°56'), Би Дуп Нуй Ба (N 12°10'44'', E 108°40'44'') и национальный парк Хоан Лиен (N 22°20', E 103°50'). Все отловленные особи предварительно идентифицировали по внешней морфологии в соответствии с опреде-

лительными таблицами и видовыми описаниями [11–12], а позднее по морфологии черепов в соответствии с краниометрическими описаниями [2, 3, 9, 11–13].

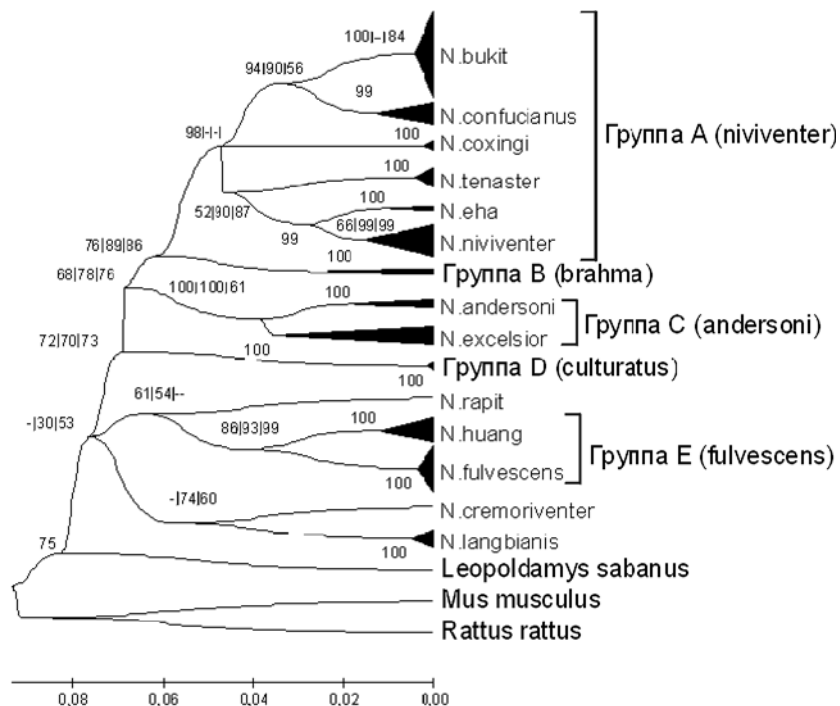
ДНК выделяли из тканей печени или мышц, фиксированных в 96%-м этаноле, по стандартной фенол-хлороформной методике [14] и очищали при помощи набора DNA Purification Kit (Fermentas). Полноразмерный ген 1143 п.н. или (для некоторых образцов) 730 п.н. фрагмент начальной части гена цитохрома *b* мтДНК амплифицировали при помощи праймеров H15915R (5'-GGAATTCATCTCTCCGGTTTACAAGAC-3') [15], Cyt bRglu2L (5'-CAGCATTTAACTGTGACTAATGAC-3') Cyt bRCb9H (5'-TACACCTAGGAGGTCTTTAATTG-3') [16]. ПЦР проводили в KCl-содержащем ПЦР буфере (Fermentas) в объеме 30–50 мкл при составе смеси 50 мМ каждого из dNTP, 2 мМ MgCl₂, 10–12 пмоль каждого из праймеров, 1U Taq ДНК-полимеразы (Fermentas) и 20–50 нг. ДНК. Амплификацию проводили по протоколу: денатурация 1 мин 30 с при 95°, 40 циклов 30 с при 95°, 1 мин при 50° и 30 с при 72°, завершающая элонгация 2 мин при 72°. ПЦР продукты очищали при помощи набора DNA Purification Kit (Fermentas) и секвенировали на секвенаторе Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzers с использованием ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit. Все новые последовательности цитохрома *b* были депонированы в Генбанк (FJ665434–FJ665466, GU456971–GU457019).

Для сравнительного анализа были привлечены все имеющиеся в Генбанке на 10 февраля 2010 г. последовательности гена Cyt *b* *Niviventer*, (EF053001–EF053032, AM408344, DQ191483). Последовательности *Rattus rattus* (AB033702), *Leopoldamys sabanus* (GU457019) и *Mus musculus* (J011420) были взяты в качестве внешних групп. Суммарно выборка составила 115 образцов.

Последовательности выравнивали при помощи программ BioEdit [17] и Clustal W. Генетические дистанции вычислены по модели Тамуры (ТЗР) в программе MEGA. 4.0. [18]. Деревья строили методами максимальной экономии (MP), минимальной эволюции (ME) и объединения соседей (NJ), реализуемыми в среде MEGA 4.0, а также максимального правдоподобия (ML) программой DNAMLK version 3.5c [19], входящей в пакет BioEdit. Уровень бутстреп-поддержки узлов вычисляли по 1000 репликаций.

Результаты и обсуждение

Из 1143 сайтов 443 переменны и 364 парсимониально информативны (с учетом внешних групп 489 и 379 соответственно). Анализируемая выборка распалась на 15 кластеров видового ранга (рисунк), видовая идентификация наших и большинства привлеченных образцов совпала с первоначально установленной. Уровень межгрупповой дивергенции (d , ТЗР) различался от 0,042 между *N. niviventer* и *N. eha* (по [10]) до 0,169 между *N. langbianis* и *N. confucianus* (таблица) при средней $0,101 \pm 0,006$, что близко к среднему уровню для млекопитающих [20]. Уровень внутригрупповой дивергенции для большинства видов, кроме *N. andersoni* и *N. brahma*, был достаточно низким (0,002—0,027, в среднем 0,0187).



Обобщенное ME/NJ/MP-дерево филогенетических отношений в роде *Niviventer*. В узлах приведены значения поддержки для ME/NJ/MP алгоритмов соответственно, одиночная цифра соответствует одинаковым значениям, прочерк — недостоверным значениям

Межвидовые генетические дистанции (d , ТЗР, $Tr + Tv$, 1 + 2 + 3 pos) в роде *Niviventer* для полноразмерного гена цитохрома *b*

	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]	[6]	[7]	[8]	[9]	[10]	[11]	[12]	[13]	[14]	[15]
[1] <i>N. bukit</i> (33)	0,007	0,008	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,012	0,011	0,012	0,012	0,012	0,012	0,013	0,014
[2] <i>N. confucianus</i> (8)	0,069	0,020	0,010	0,010	0,009	0,009	0,012	0,011	0,012	0,011	0,013	0,013	0,013	0,014	0,014
[3] <i>N. coxingi</i> (3)	0,095	0,095	0,004	0,010	0,009	0,010	0,012	0,012	0,012	0,013	0,013	0,012	0,013	0,013	0,015
[4] <i>N. tenaster</i> (7)	0,098	0,097	0,102	0,007	0,010	0,010	0,012	0,011	0,012	0,012	0,013	0,012	0,014	0,014	0,017
[5] <i>N. eha</i> (2)	0,093	0,089	0,087	0,096	0,020	0,008	0,010	0,010	0,012	0,013	0,014	0,012	0,013	0,012	0,012
[6] <i>N. niviventer</i> (12)	0,094	0,087	0,096	0,093	0,058	0,019	0,011	0,011	0,013	0,013	0,013	0,014	0,015	0,013	0,014
[7] <i>N. brahma</i> (2)	0,121	0,121	0,140	0,137	0,110	0,122	0,047	0,011	0,011	0,012	0,013	0,012	0,012	0,013	0,012
[8] <i>N. andersoni</i> (3)	0,136	0,130	0,141	0,142	0,105	0,109	0,147	0,033	0,007	0,013	0,014	0,013	0,013	0,012	0,016
[9] <i>N. excelsior</i> (7)	0,137	0,138	0,139	0,146	0,142	0,144	0,150	0,077	0,027	0,012	0,013	0,012	0,012	0,011	0,016
[10] <i>N. culturatus</i> (3)	0,133	0,120	0,140	0,153	0,152	0,146	0,155	0,155	0,141	0,002	0,011	0,013	0,012	0,013	0,015
[11] <i>N. rapit</i> (1)	0,143	0,145	0,150	0,154	0,163	0,143	0,151	0,169	0,155	0,137	—	0,012	0,012	0,013	0,014
[12] <i>N. huang</i> (9)	0,150	0,150	0,143	0,148	0,142	0,157	0,149	0,154	0,151	0,141	0,135	0,017	0,009	0,011	0,015
[13] <i>N. fulvescens</i> (17)	0,153	0,147	0,156	0,170	0,159	0,165	0,151	0,156	0,146	0,146	0,125	0,083	0,008	0,011	0,015
[14] <i>N. langbianis</i> (7)	0,165	0,165	0,160	0,173	0,157	0,153	0,160	0,161	0,141	0,149	0,155	0,136	0,134	0,008	0,014
[15] <i>N. cremoriventer</i> (1)	0,145	0,128	0,128	0,153	0,125	0,134	0,118	0,161	0,154	0,152	0,121	0,147	0,135	0,117	—
Overall groups 15, n = 115															

Примечание. Межгрупповые дистанции снизу слева, ошибки сверху справа. Средние внутригрупповые дистанции на диагонали. Количество исследованных гаплотипов (n) приведено в скобках.

У нескольких особей *N. bukit*, *N. confucianus*, *N. fulvescens* и *N. cremoriventer* секвенированы только начальные 730 н.о., для построения матрицы дистанций применена опция pairwise deletion.

Все полученные деревья (MP, ME, NJ, ML) имели схожую топологию, различаясь лишь уровнем поддержки некоторых узлов. *N. andersoni* и *N. excelsior* на некоторых MP-деревьях имеют тенденцию образовывать общий кластер, что может ставить вопрос о видовой независимости этих форм. Сходным образом уровень дивергенции образцов, называемых у Jing et al. [10] *N. eha*, от *N. niviventer* столь незначителен, что вызывает сомнения в видовом статусе этой формы или в правильности видовой идентификации образцов. На рисунке приведено обобщенное дерево, полученное ME, NJ и MP методами.

Внутри монофилетического рода *Niviventer* можно выделить не менее пяти достоверных клад — (A—E). Кладу A образует группа близкородственных видов в составе *N. niviventer*, *N. confucianus*, *N. coxingi*, *N. eha*, *N. bukit* и *N. tenaster*. Среди них более близкородственными являются пары *N. confucianus*—*N. bukit* и *N. niviventer*—*N. tenaster*, статус образцов, обозначенных как *N. eha*, требует уточнения. Отдельные кладу B и D образуют *N. brahma* и *N. culturatus*. Ранее выделенная группа *andersoni* образует отдельную кладу (C). Отношение между оставшимися пятью видами, занимающими базальное положение, однозначно не разрешается. Достоверно может быть выделена лишь группа, названная здесь как группа E, объединяющая близкие виды *N. fulvescens* и *N. huang*. Положение же малайских и сундских представителей рода — *N. cremoriventer* и *N. rapit*, а также *N. langbianis* остается неопределенным.

Все выявленные кладу (A—E) имеют достаточно высокий уровень поддержки и могут служить для выделения внутри рода дополнительных дивизи-

зий. Кроме группы *andersoni*, из состава явно сборной группы *niviventer* могут быть выделены не менее 4 дополнительных групп. За первой из них (клада A) можно сохранить название группа-*niviventer*. Из этой группы должна быть выделена группа *fulvescens*, образуемая *N. fulvescens* и *N. huang*. Последний вид, ранее рассматриваемый как синоним *N. fulvescens*, как видно из рисунка и таблицы, по уровню дивергенции вполне соответствует видовому статусу. Эта группа не близкородственна группе *niviventer*, как это принято в современной систематике рода [9]. *N. brahma* и *N. culturatus* формируют одноименные монотипические группы. Возможно выделить и пятую, которую образует *N. langbianis*. Этим пяти группам (*andersoni*, *niviventer*, *fulvescens*, *brahma*, *culturatus* и, возможно, *langbianis*) целесообразно придать систематический статус. Одновременно, учитывая, что большая часть малайских и сундских представителей рода до сих пор остаются генетически не охарактеризованными, можно предполагать, что список групп еще не полон.

Работа проведена на базе и при финансовой поддержке Российско-Вьетнамского Тропического Центра, Южное Отделение, г. Хошимин. Мы благодарны А.В. Абрамову (ЗИН РАН), А.В. Щинову и Д.С. Макарову (ИПЭЭ им. А.Н. Северцова РАН), которые предоставили значительную часть первичного материала, а также Нгуен Ван Тхиню и Чан Ван Чыонгу, сотрудникам Южного Отделения Российско-Вьетнамского Тропического Центра, г. Хошимин и дирекции заповедников Нам Кат Тьен, Би Дуп Нуй Ба, Ло Го Са Мат и Хоан Лиен за административную помощь в проведении работ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Musser G.G., Chiu S. Notes on taxonomy of *R. andersoni* and *R. excelsior*, murid endemic to western China // J. Mammol. 1979. Vol. 60. P. 592—606.
2. Musser G.G. Results of the Archbold Expeditions #.105 Notes on systematics of Indo-Malayan murid rodents and descriptions of new genera and species from Ceylon, Sulawesi and the Philippines // Bulf. Amer. Mus. (Nat. Hist). 1981. Vol. 168(3). P. 236—256.
3. Musser G.G. Species-limits of *Rattus cremoriventer* and *Rattus langbianis*, Murid rodents of southeastern Asia and the Greater Sunda Islands // American Museum Novitates. 1973. N 2525. P. 1—65.
4. Marshall J.T.J. Family Muridae (rats and mice) // Mammals of Thailand. 1976. P. 397—487.
5. Кузнецов Г.В. Млекопитающие Вьетнама. М.: Тов. научных изданий КМК, 2006. 420 с.
6. Nowak R.M. Mammals of the World. Baltimore; London: The Johns Hopkins University Press, 1999.
7. Wang Y.X. A Complete Checklist of Mammal species and Subspecies in China: A Taxonomic and Geographic Reference. Beijing: China Forestry Publishing House, 2003.
8. Павлинов И.Я. Систематика современных млекопитающих. 2-е изд. М.: Изд-во Моск. ун-та. 2006. 297 с.
9. Mammal Species of the World. A Taxonomic and Geographic Reference (3rd ed) / Eds. D.E. Wilson, D.-A.M. Reeder. Johns Hopkins University Press, 2005. 142 p. (<http://www.press.jhu.edu>).
10. Jing M., Yu H.-T., Wu Sh.-H., Wang W., Zheng X. Phylogenetic relationships in genus *Niviventer* (Rodentia: Muridae) in China inferred from complete mitochondrial cytochrome *b* gene // Mol. Phylogenet. Evol. 2007. Vol. 44. P. 521—529.
11. Corbet G.B., Hill J.E. The Mammals of the Indo-Malayan Region: A Systematic Review. Oxford: Oxford University Press, 1992.
12. Lunde D., Nguyen Truong Son. An identification guide to the rodents of Vietnam. Center for Biodiversity and Conservation, AMNH. New York, 2001. 80 p.
13. Stephen C., Rudolf M. Contribution to the taxonomic status of the Chinese rats *Niviventer confucianus* and *N. fulvescens* // Mamm. Biol. Vol. 72. N 4. 2007. P. 213—222.
14. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Lab., 1989.
15. Irwin D., Kocher T.D., Wilson A.S. Evolution of the cytochrome *b* gene of mammals // J. Mol. Evol. 1991. Vol. 32. P. 128—144.

16. Robins J.H., Hingston M., Matisoo-Smith E., Ross H.A. Identifying *Rattus* species using mitochondrial DNA // Molecular Ecology Notes. 2007. Vol. 7. P. 717–729.
17. Hall T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT // Nucl. Acids Symp. Ser. 1999. Vol. 41. P. 95–98.
18. Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 // Molecular Biology and Evolution. 2007. Vol. 24. P. 1596–1599.
19. Felsenstein J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach // J. Mol. Evol. 1981. Vol. 17(6). P. 368–376.
20. Bradley R.D., Baker R.J. A test of the genetic species concept: cytochrome-b sequences and mammals // J. Mammal. 2001. Vol. 82. P. 960–973.

Поступила в редакцию
13.04.10

**PHYLOGENIC RELATIONSHIPS AND SPECIES COMPOSITION
IN THE GENUS *NIVIVENTER* (RODENTIA: MURIDAE) IN VIETNAM
AS INFERRED FROM MITOCHONDRIAL CYTOCHROME *b* GENE**

A.E. Balakirev, V.V. Rozhnov

The article concerned to phylogenic relationships among *Niviventer* species inhabited Indochina. 15 separated species-level clades were revealed in the genus. The data obtained performed us to argue new conception on intrageneric structure and established new, more complex taxonomical structure of the genus. Four to five additional division may well been established in genus along with one (*andersoni* division) currently accepted: *niviventer*, *fulvescens*, *brahma*, *culturatus* and may be *langbianis*. These divisions combine together 13 from 15 currently genetically characterized *Niviventer* species, the other not least than 2 Sundaic and Malayan species hardly if any can be faultlessly attributed to any of these taxa. Additional investigations based on more complex data have to be performed to make clear their position in the genus.

Key words: *Niviventer*, phylogeny, taxonomic structure.

Сведения об авторах

Балакирев Александр Евгеньевич — канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории микроэволюции млекопитающих Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН; зав. лабораторией общей и прикладной экологии Совместного Российско-Вьетнамского Тропического научно-исследовательского и технологического центра. Южное отделение, г. Хошимин, Вьетнам, Тел. +7 9165897612 +84 0946059487; e-mail: alexbalakirev@mail.ru

Рожнов Вячеслав Владимирович — докт. биол. наук, зам. директора ин-та по науке Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН. Тел. +7(495)952-73-05; e-mail: rozhnov.v@gmail.com