

Поплавская
Наталья Сергеевна

АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ КОМПЛЕКСА
CRICETULUS BARABENSIS SENSU LATO
(RODENTIA, CRICETIDAE) В СВЯЗИ С ПРОБЛЕМОЙ ВИДА

03.02.04 – зоология

03.02.07 – генетика

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Москва – 2013

Работа выполнена в лаборатории сравнительной этологии и биокommunikации Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук.

Научные руководители:

Суров Алексей Васильевич
доктор биологических наук,
заведующий лабораторией сравнительной этологии и биокommunikации
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института проблем экологии и эволюции
им. А.Н. Северцова Российской академии наук

Банникова Анна Андреевна
кандидат биологических наук, старший научный сотрудник
кафедры зоологии позвоночных Биологического факультета
Федерального государственного бюджетного образовательного
учреждения высшего профессионального образования
Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

Официальные оппоненты:

Баклушинская Ирина Юрьевна
доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник
лаборатории цитогенетики Федерального государственного
бюджетного учреждения науки Института биологии развития
им. Н.К. Кольцова Российской академии наук

Сорокин Павел Александрович
кандидат биологических наук, научный сотрудник
кабинета методов молекулярной диагностики
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова
Российской академии наук

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего профессионального образования
«Пензенский государственный университет»

Защита состоится 10 декабря 2013 года в 14 часов на заседании Совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 002.213.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук по адресу:

119071 Москва, Ленинский проспект, дом 33 Тел/факс: +7 (495) 939-43-09;
E-mail: zashita@sevin.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Отделения общей биологии РАН по адресу: 119071 Москва, Ленинский проспект, дом 33.

Автореферат разослан 8 ноября 2013 г.

Ученый секретарь совета по защите
докторских и кандидатских диссертаций

кандидат биологических наук
Елена Александровна Кацман

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Изучение процессов микроэволюции является одной из самых актуальных тем эволюционной биологии. Сегодня предлагается множество разных моделей видообразования, а также концепций, определяющих само понятие вида и критерии для проведения границы между разными видами (Mayden, 1997; de Queiroz, 2007). Однако нет ни одной концепции вида, которая могла бы предложить универсальное определение вида и единые критерии его диагностики (Павлинов, 2009), и чаще всего нет однозначного ответа, в рамках какой концепции корректнее всего исследовать интересующий объект. Начиная с некоторого уровня дивергенции, использование практически любой концепции с ее критериями разделения видов будет давать однозначное подтверждение видового статуса исследуемых форм. Но понять в этом случае, какие факторы первоначально вызвали их дифференциацию, может быть затруднительно. Для изучения формообразования как процесса, наиболее перспективным объектом являются недавно разделившиеся в процессе эволюции виды и внутривидовые группировки животных. Из-за неравномерности эволюции по разным системам признаков такие группы могут характеризоваться существенными различиями по одним параметрам и быть практически неотличимыми по другим. В итоге ответ на вопрос о разграничении близких видов будет во многом зависеть от признаков, выбранных для анализа.

Следовательно, для корректного определения таксономического статуса и степени дивергенции близких форм, а также понимания механизмов эволюции изучаемой группы, актуально исследовать такие таксоны по максимальному набору признаков и в контексте сразу нескольких концепций вида. С научной точки зрения не столь важным будет, на наш взгляд, обозначить рамки вида и сделать вывод о таксономическом статусе, т.к. он может со временем измениться вместе со сменой тенденций в систематике, сколько определить стадию процесса видообразования форм, понять, какие факторы играют главную роль в эволюции исследуемой группы животных. Важную роль здесь, несомненно, играет изучение взаимоотношений близких форм животных в природе в условиях симпатрии или парапатрии, в том числе информация о том, образуют ли они гибридную зону, и если да, то какова ее ширина, и насколько далеко распространяются в гибридных популяциях различные генетические и морфологические маркеры.

Перспективным, на наш взгляд, является одновременное использование биологической (Dobzhansky, 1937; Mayr, 1942) и типологической концепций вида, которые традиционно противопоставляются друг другу. Также в последнее время в силу распространения молекулярных методов исследования большую популярность приобрела генетическая концепция вида, впервые предложенная еще в начале XX века (Bateson 1909; Muller 1939; Baker, Bradley, 2006). Эта концепция автору данной работы наиболее близка, поскольку сочетает в себе и типологический, и биологический подходы.

Объект нашего исследования – барабинские хомячки, (комплекс *Cricetulus barabensis* sensu lato). Эта группа представляет собой интересный и перспективный объект для изучения процесса видообразования, хотя по сравнению с такими популярными в микроэволюционных работах видами, как домовая мышь (*Mus musculus* Linnaeus, 1758) или обыкновенная буроzubка (*Sorex araneus* Linnaeus, 1758), ранее ей не уделялось большого внимания.

Барабинские хомячки широко распространены в степных и полупустынных районах Палеарктики. В период бурного развития цитогенетических методов, на основании обнаруженных различий в кариотипах животных из разных географических точек, группу разделили на четыре самостоятельных вида (Matthey, 1952; Орлов, Исакова, 1975; Орлов, Малыгин, 1988):

1. *Cricetulus barabensis* sensu stricto Pallas, 1773 – барабинский хомячок ($2n=20$, $NF=38$);
2. *C. griseus* Milne-Edwards 1871 – китайский хомячок ($2n=22$, $NF=38$);
3. *Cricetulus pseudogriseus* Orlov et Iskhakova, 1975 – забайкальский хомячок ($2n=24$, $NF=38$);
4. *Cricetulus sokolovi* Orlov et Malygin 1988 – гобийский хомячок ($2n=20$, $NF=40$).

В настоящее время таксономия группы остается дискуссионной. Согласно одной точке зрения в группе по-прежнему выделяется 4 вида (Малыгин и др., 1992). Другие исследователи, напротив, объединяют все формы в один политипический вид с несколькими подвидами (Zhang et al., 1997). Наконец, по третьему мнению, *Cricetulus sokolovi* выделяется в самостоятельный вид, а остальные три хромосомные формы (“barabensis”, “pseudogriseus” и “griseus”) рассматриваются как подвиды в составе единого политипического вида (Musser, Carleton, 2005, Лебедев, 2012). Так-

же в качестве подвидов могут трактоваться некоторые географические группировки в составе кариоформы “*barabensis*” (Лебедев, Лисовский, 2008): *C. b. barabensis* Pallas, 1773 (Алтай), *C. b. tuvunicus* Iskhakova 1974 (Тува, Монголия, Бурятия), *C. barabensis* ssp, не описан (Забайкальский край), *C. b. xinganensis* Wang 1980 (Амурский регион и ЕАО), *C. b. ferrugineus* Argurovulo 1940 (Приморский край). Последнему варианту номенклатуры следует автор настоящей работы.

Степень разработанности темы исследования. Результаты проведенных ранее исследований краниометрических и молекулярных признаков демонстрируют значительные отличия *C. sokolovi* от других трех кариоформ, уровень различий между которыми невысок и не позволяет с уверенностью сделать заключение о таксономическом статусе (Лебедев, Лисовский, 2008; Lebedev et al., 2008).

При этом такие важные факты как возможность скрещивания, наличие контактных зон, уровень изменчивости ядерной ДНК кариоформ в группе барабинских хомячков остаются до сих пор неизученными, что определило направление данной работы.

Цель работы: выявить генетическую структуру видового комплекса *Cricetulus barabensis* sensu lato и характер взаимоотношений современных форм в его составе, оценить степень их дивергенции.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Установить наличие/отсутствие репродуктивной изоляции между тремя кариоформами с помощью лабораторных опытов по гибридизации.
2. Уточнить границы ареалов кариоформ “*barabensis*” и “*pseudogriseus*” в зонах их потенциального контакта, а также провести поиск следов гибридизации.
3. Для выявления интрогрессии исследовать митохондриальную и ядерную ДНК кариоформ “*barabensis*” и “*pseudogriseus*” из зон потенциального контакта.
4. На основе молекулярных данных по внутри- и межпопуляционной изменчивости хромосомных форм оценить степень их дивергенции и реконструировать генетическую структуру видового комплекса.

Научная новизна. Впервые проведен комплексный анализ структуры и отношений в группе барабинских хомячков с использованием молекулярных данных по нескольким маркерам и данных гибридологического

анализа, а также результатов по взаимоотношению двух кариоформ в природе. Впервые получены лабораторные гибриды первого поколения между кариоформами “pseudogriseus”, “griseus” и “barabensis”, подтверждена их плодовитость. Показано обитание хомячков, принадлежащих к кариоформам “pseudogriseus” и “barabensis” в ряде неизвестных ранее локалитетов, в том числе уточнены границы их распространения в зонах потенциального контакта. Проанализирована полная последовательность гена цитохрома *b* для большого числа животных из локалитетов на значительной части ареала группы барабинских хомячков, что позволило впервые выявить популяционную изменчивость этого маркера. Впервые для барабинских хомячков получены и проанализированы данные по изменчивости шести микросателлитных локусов, также на значительной части ареала группы.

Теоретическая и практическая ценность работы. Работа имеет теоретическое значение для познания процессов формирования биоразнообразия и закономерностей микроэволюции, т.к. в ней проанализирована ситуация, когда хромосомные формы находятся на стадии видовой дифференциации. Результаты данного исследования вносят вклад в понимание многообразных и сложных факторов видообразования, и явления интрогрессии у позвоночных. Использование в работе комплексного подхода предоставляет широкий спектр возможностей для сравнения полученных результатов с данными по другим группам мелких млекопитающих. Проведенные исследования финансировались Российским Фондом Фундаментальных Исследований (№№09-04-00701, 08-04-00029, 11-07-00020, 12-04-92212), а также грантами Президиума РАН «Биологическое разнообразие: динамика генофондов» и «Живая природа» и соответствующих задачам этих фондов.

Результаты работы могут быть применены в практических мероприятиях, использующих данные таксономических исследований и сведения по инвентаризации фауны (при составлении кадастров, разработке стратегии и тактики охраны генофондов, проведении экологического мониторинга и т.п.).

Также полученные результаты могут быть включены в программу спецкурсов биологических вузов и использованы при разработке методических пособий.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 3 статьи в рецензируемых журналах и 9 тезисов конференций.

Апробация работы. Основные результаты работы были доложены на 9 конференциях: «Актуальные проблемы экологии и эволюции в исследованиях молодых ученых» (Москва, 2006); VIII международный съезд Российского териологического общества, (Москва, 2007); 11-th “Rodens et Spatium”, (Мышкин, 2008); «Современные проблемы зоо- и филогеографии млекопитающих», (Пенза, 2009); 15-th EMPSEB (Шорль, 2009); 12-th “Rodens et Spatium”, (Зонгулдак, 2010); VI-th ECM, (Париж, 2011); «Проблемы популяционной и общей генетики», (Москва, 2011); “Хромосома 2012” (Новосибирск, 2012). Также результаты обсуждались на объединенном научном коллоквиуме лаборатории сравнительной этологии и биокommunikации и лаборатории поведения и поведенческой экологии млекопитающих ИПЭЭ РАН 14 октября 2013 г.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на «...» страницах машинописного текста и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследования, их обсуждение, заключение, выводы, список иллюстративного материала и библиографический список. Работа иллюстрирована «...» таблицами, «...» рисунками. Список литературы включает «...» наименований, в том числе «...» иностранных источников. Приложения содержат «...» таблиц и «...» рисунков.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы, поставлены цели и задачи исследования.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В обзоре литературы рассматриваются основные теоретические подходы к определению вида и его практической диагностике, анализируется выбор актуального для данной работы подхода. Далее приводятся некоторые особенности эволюции подсемейства *Cricetinae*, история описания группы барабинских хомячков и основные результаты исследований, проведенных на этом объекте. Кроме того, дается краткое обоснование примененных методик.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Отлов животных проводился во время полевых сезонов 2003–2011 гг. в России и в Монголии экспедиционным отрядом в составе Совместной Российско-Монгольской комплексной биологической экспедиции РАН, в том числе лично автором.

Образцы тканей для генетического анализа животных из ряда локалитетов были любезно предоставлены Абрамовым А.В., Феоктистовой Н.Ю., Мещерским И.Г., Кораблевым В.П., Павленко М.В., Баженовым Ю.А., Картавцевой И.В., Брандлером О.В., Лисовским А.А., Агаджаняном А.К., Росиной В.В., Лопатиной Н. В., Войта Л. Л., Шефтелем Б.И.

Гибридизация в лаборатории. Опыты по гибридизации проводились в виварии и на НЭБ «Черноголовка» ИПЭЭ РАН. В них участвовали 31 самец и 43 самки, относящиеся к трем кариоформам, а также 4 самца и 4 самки гибридов F1. Опыты проводились путем ссаживания животных на нейтральной территории на короткое время под контролем экспериментатора. Для ссаживания использовали только самок в состоянии эструса, наступление которого определяли по влагалищным мазкам (Яковенко, 1974).

Генетический анализ. С применением цитогенетических и молекулярных методов был проанализирован 531 хомячок. В выборку вошли представители трех кариоформ комплекса *Cricetulus barabensis* sensu lato (в т.ч. особи всех известных подвидов кариоформы “barabensis”) и *C. sokolovi* из 96 локалитетов (рис. 1), а также *C. longicaudatus* Milne-Edwards, 1867 (в

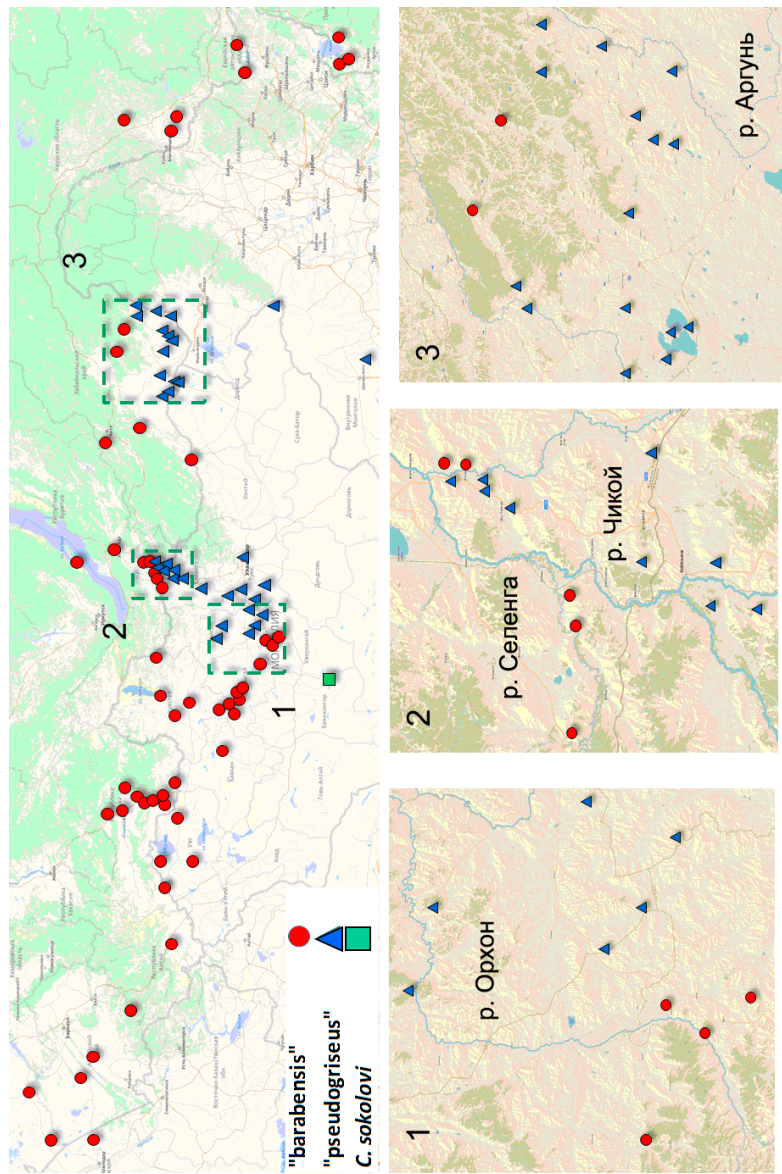


Рис. 1. Места отлова животных для работы. В увеличенном масштабе показаны места отлова в зонах потенциального контакта. 1. Ц. Монголия, сомон Хархорин. 2. Ю. Бурятия, район слияния рек Селенга и Чикой. 3. Забайкальский край, район междуречья рек Аргунь и Газимур.

качестве внешней группы). В выборке кариоформы “griseus” часть хомячков происходила из лабораторных линий, для остальных точные места отловов неизвестны.

Кариотипирование и анализ хромосом проводились в лаборатории сравнительной этологии и биокommunikации ИПЭЭ РАН, а также во время экспедиций в условиях полевой лаборатории. Кариотипы исследованы у 79 хомячков кариоформ «barabensis» и «pseudogriseus» из природных популяций, отловленных в 21 локалитете в Бурятии и Монголии (из них 10 локалитетов в зонах потенциального контакта), а также у двух самцов гибридов F1 и самца и самки гибридов следующего поколения, родившихся в виварии. Для получения препаратов метафазных хромосом использовали стандартный метод высушенных препаратов, на основе методики Форда и Хэммертона (Ford, Hamerton 1956) модифицированный В.Н. Орловым (Орлов и др., 1976) с некоторыми незначительными вариациями.

Молекулярными методами анализа были исследованы хомячки комплекса *Cricetulus barabensis* sensu lato, а также виды *C. sokolovi* и *C. longicaudatus* (в качестве внешней группы).

Полная последовательность гена цитохрома b (далее *cytb*) исследована для 462 экземпляров из 89 локалитетов, в том числе 204 образца происходили из 19 локалитетов в трех зонах потенциального контакта кариоформ “barabensis” и “pseudogriseus”. В эту выборку последовательности *cytb* для 5 образцов добавлены в анализ из базы ГенБанк и 16 последовательностей любезно предоставлены для анализа К. Нойманном (K. Neumann). Частичная последовательность интрона гена DBY1, локализованного в Y-хромосоме, отсеквенирована для 53 экземпляров из 13 локалитетов, в том числе 44 экземпляра из 7 локалитетов в зонах потенциального контакта. Микросателлитный анализ был проведен по 6 локусам, были типированы 442 экземпляра из 70 природных локалитетов, в том числе 205 экз. из 18 локалитетов в зонах потенциального контакта.

Выделение ДНК, амплификацию *cyt b*, DBY1 и микросателлитных локусов проводили в кабинете молекулярных методов на кафедре зоологии позвоночных МГУ им. М.В. Ломоносова. Геномную ДНК выделяли из фиксированных этанолом мышц и печени стандартным методом фенол-хлороформной депротеинизации (Sambrook et al., 1989). Для амплификации и секвенирования использовано 18 праймеров.

Автоматическое секвенирование проведено с использованием ABI PRISM®BigDye™ Terminator v. 3.1 на секвенаторе ABI 3100-Avant в ла-

боратории ЦКП «Геном» и на секвенаторе AB 3500 в кабинете методов молекулярной диагностики ИПЭЭ РАН.

Обработка данных молекулярно-генетического анализа. Полученные последовательности выравнивали в программах BioEdit 7.0.5.3и SeqMan Pro v.7.1.0 с доводкой вручную. Сети гаплотипов были построены в программе Network 4.6.1.1. Реконструкция филогенетических деревьев была выполнена методом ближайшего связывания (NJ) в программе Mega 5.1 и с помощью байесова анализа в программе Beast v.1.7.5. Деревья по матрицам дистанций между популяциями были построены методом NJ в программе PAUP* ver.4.0b10. Показатели разнообразия и матрицы дистанций между выборками для данных по изменчивости *cytb* и микросателлитных локусов рассчитывались в программах Arlequin 3.5.1.3, DnaSP v.5.10.01, GenAlex 6.5, Freena, Microchecker 2.2.3. Моделирование изменений эффективной численности популяций проведено в программе Beast методом Skyline Plot. Генетическая структура комплекса по микросателлитным данным и поиск интрогрессии исследованы с помощью программы BAPS 5.3.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1 Лабораторная гибридизация

В контрольных опытах для всех трех кариоформ в результате 51 спаривания получены 18 выводков; в результате 30 спариваний между кариоформами получено 8 гибридных выводков F1 (рис. 2). В 6 спариваниях с участием гибридов первого поколения получены 3 выводка. Число детенышей в гибридных выводках колебалось от 2 до 8, в контрольных – от 2 до 6. Признаков нарушения жизнеспособности гибридов и каких-либо отклонений в развитии обнаружено не было.

3.2 Работа в зонах контакта и поиск интрогрессии

В результате типирования особей хомячков из зон потенциального контакта кариоформ «*barabensis*» (2n=20) и «*pseudogriseus*» (2n=24) не зарегистрировано случаев их совместного обитания. При этом в Бурятии кариоформы обитали по разным берегам р. Чикой в районе ее слияния с р. Селенга и расстояние между локалитетами разных форм по прямой в некоторых местах не превышало 5 км (рис. 1).

В Монголии ближайшие локалитеты двух кариоформ разделены дистанцией около 50 км без заметных географических барьеров (рис. 1) (фор-

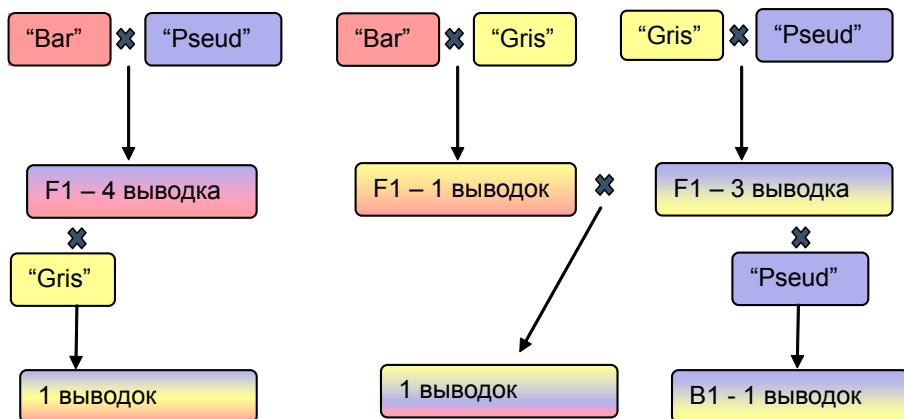


Рис. 2. Схема гибридизации кариоформ в лабораторных опытах

ма «barabensis» – популяция из сомона Хархорин, форма «pseudogriseus» – популяции из окр. сомона Хашат и песков Монголын-Элс).

В Забайкальском крае наиболее перспективной областью для поиска контакта между кариоформами оказывается участок междуречья р. Газимура и Аргуни. Расстояние между известными местами отлова разных кариоформ здесь составляет около 80 км также без выраженных географических преград. Здесь возможен контакт формы «pseudogriseus» и

уже другого подвида 20-хромосмной формы, неопisanного *S. barabensis* ssp (см. Лебедев, Лисовский, 2008).

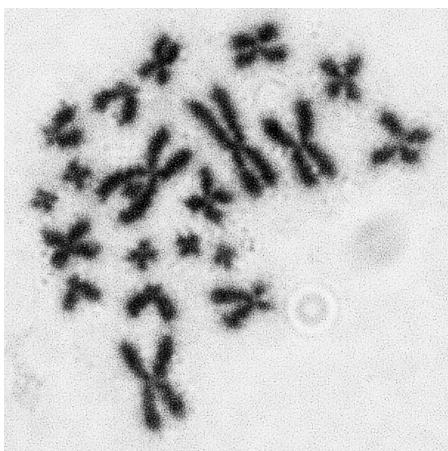


Рис. 3. Метафазная пластинка ($2n=21$) самца из сомона Хархорин.

Все изученные нами кариотипы форм «barabensis» $2n=20$ и «pseudogriseus» $2n=24$ соответствуют описанным ранее (Малыгин и др., 1992; O'Brien et al., 2006; Romanenko et al., 2007), за одним исключением: в популяции «barabensis» из окрестностей сомона Хархорин были обнаружены два самца с $2n=21$. Хромосомы среднего размера в этом кариоти-

пе представлены пятью метацентриками и четырьмя акроцентриками (рис 3).

Из всех проанализированных образцов не было найдено случаев несоответствия митотипа кариотипу или морфотипу. Анализ частичной последовательности интрона DBY1 показал, что для каждой кариоформы характерен свой аллель этого гена. Ни одного случая интрогрессии этого маркера найдено также не было.

Визуальный и статистический анализ распространения микросателлитных аллелей в популяциях двух кариоформ выявил некоторое количество предположительно гибридных особей в ряде популяций, в основном из зон потенциального контакта. Большинство из таких особей происходят из популяции в окр. Хархорина (8 из 40 исследованных в этой популяции особей).

3.3 Анализ изменчивости гена *cytb*

Чтобы реконструировать генетическую структуру комплекса *Cricetulus barabensis* sensu lato, в работе установлены филогенетические отношения между гаплогруппами мтДНК и исследовано их соответствие группам популяций и морфологическим подвидам, а также проведен сравнительный анализ популяционно-генетической изменчивости кариоформ “barabensis” и “pseudogriseus”.

На NJ дереве гаплотипов (рис. 4) выделяются группировки, соответствующие известным кариоформам, причем если “griseus” и “pseudogriseus” составляют монофилетические ветви, сближенные друг с другом относительно остальных кластеров, то “barabensis” оказывается парафилетическим из-за обособленного положения приморского подвида *C. b. ferrugineus*. *C. b. tuvinicus* в свою очередь парафилетичен относительно *C. b. barabensis*. *C. b. barabensis* занимает дочернее положение относительно *C. b. tuvinicus*. Эти результаты соответствуют уже описанным во введении. Неисследованные ранее образцы неопisanного подвида 20-хромосомной формы из Забайкальского края образуют единый кластер с амурским подвидом *C. b. xinganensis*. И если сближение алтайского *C. b. barabensis* с *C. b. tuvinicus*, а неопisanного забайкальского подвида *C. barabensis* ssp с амурским *C. b. xinganensis* соответствует их географическому распределению на ареале, то отдаленность друг от друга амурских и приморских хомячков следует отметить как несоответствие молекулярных и географических данных.

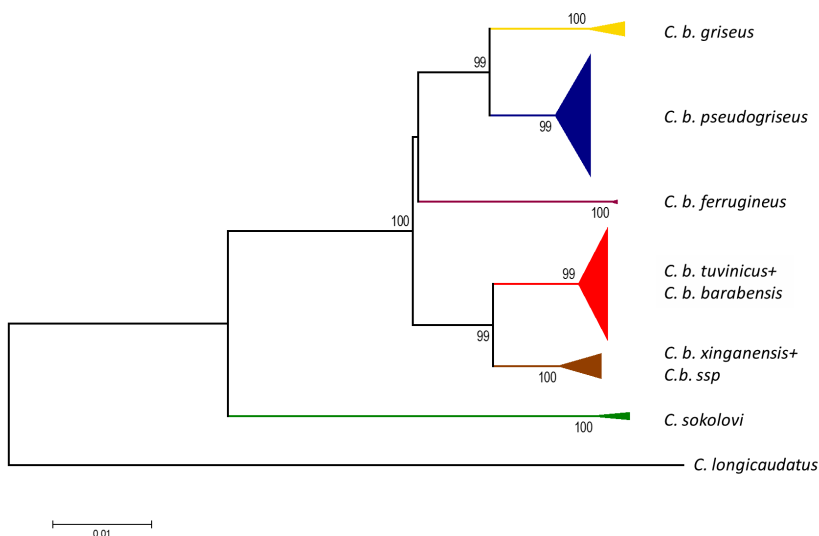


Рис. 4. Филогенетическое дерево гаплотипов *cytb* (метод NJ, программа Mega 5.1, р-дистанции по полной последовательности *cytb* 1140нп). В узлах указаны индексы бутстрэп-поддержки (1000 реплик).

Показатели гаплотипического (h) и нуклеотидного (p) разнообразия

Во всех крупных выборках (кариоформы, подвиды, регионы) уровень гаплотипического разнообразия оказался достаточно высоким, (0.816–0.968) за исключением выборки алтайского подвида *C. b. barabensis*, где он составил 0.562. Средний уровень – 0.875.

Уровень нуклеотидного разнообразия в крупных выборках самым высоким оказался у кариоформы “griseus”, и у кариоформы “barabensis”. Пониженным по сравнению с остальными выборками уровнем разнообразия характеризуются алтайский подвид *C. b. barabensis*, неописанный забайкальский подвид *C. barabensis* ssp и выборка из региона Забайкалье кариоформы “pseudogriseus”. Диапазон значений p – от 0.00133 до 0.0136, среднее значение – 0,005.

При сравнении локальных популяций следует отметить наиболее низкие показатели гаплотипической изменчивости для локалитетов формы “barabensis” с Алтая (Завьялово), из Амурского региона (Амурзет) и Забайкальского края (Балей, Газимур). Самый низкий показатель – популя-

ция Курай (Тува). Среднее значение $h=0,746$, диапазон значений от 0.05 до 1. Кариоформа “pseudogriseus” имеет достоверно более высокие показатели p и h по сравнению с формой “barabensis” (тест Mann-Whitney, $P<0.01$).

Исследование стабильности популяций

Для исследования того, испытывала ли популяция в недавнем прошлом внезапные изменения эффективной численности, применяли тесты на основе статистик Таджимы, Фу и R_2 . Результаты отвергают стабильность популяций в течение последнего времени только для выборок Завьялово – подвид *C. b. barabensis*, западный край ареала кариоформы “barabensis” (Tajima’s D p -value = 0.002), Тере-Холь – подвид *C. b. tuvinicus*, регион Тува (FS p -value = 0.01; R_2 p -value=0.01986) и Монголын-Элс – юго-западный край ареала кариоформы “pseudogriseus” (Tajima’s D p -value = 0.043).

Результаты моделирования изменений эффективной численности во времени (Bayesian Skyline Plot) как для объединенных выборок каждой кариоформы, так и для регионов, групп и отдельных популяций не выявили заметных изменений эффективной численности ни в одной из исследованных выборок – ее колебания ни в одном из случаев не превышали доверительного интервала.

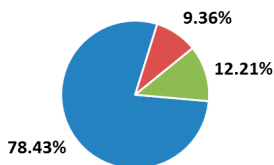
AMOVA и тест Мантела

Результаты теста Мантела указывают на существование достоверной корреляции между географической и генетической дистанциями для кариоформ “barabensis” и “pseudogriseus” по данным изменчивости *cytb* и микросателлитных локусов.

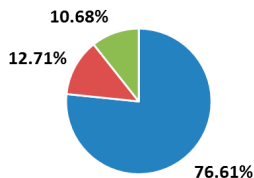
Для выявления генетической структуры кариоформ произведена оценка компонент изменчивости по митохондриальным данным с применением метода AMOVA. Показатели вклада в изменчивость при разделении всей выборки на три кариоформы (рис. 5А), и для подвидов внутри кариоформы barabensis оказались очень похожи (рис. 5Б).

При разделении выборок подвида *C. b. pseudogriseus* (рис. 5Г) и подвида *C. b. tuvinicus* (рис. 5В) на региональные выборки (для каждого подвида было выделено по три географических региона) видно, что у *C. b. pseudogriseus* намного меньший вклад в изменчивость дает компонент изменчивости между регионами, и очень высока доля изменчивости внутри популяций, в то время как у *C. b. tuvinicus* изменчивость между регио-

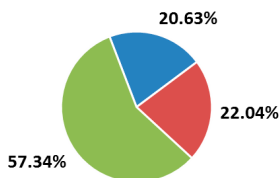
А) Подвиды кариоформы "barabensis"



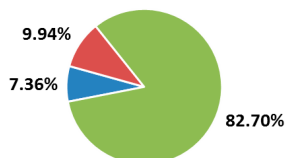
Б) Кариоформы



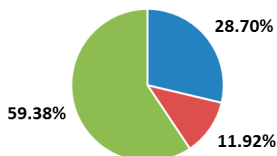
В) Регионы подвида *C. b. tuvinicus*



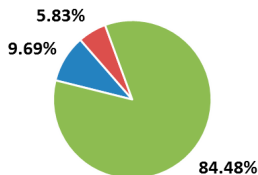
Г) Регионы подвида *C. b. pseudogriseus*



Д) Группы подвида *C. b. tuvinicus*



Е) Группы подвида *C. b. pseudogriseus*



Компоненты изменчивости

- Между группами
- Между популяциями внутри групп
- Внутри популяций

Рис. 5. Результаты анализа компонент изменчивости *cytb* (AMOVA). Элементы круговых диаграмм отражают доли изменчивости, объясняемой изменчивостью между гаплотипами внутри популяций, между популяциями и между группами популяций

нами существенно выше. При разделении выборок тех же подвидов на группы географически близких популяций заметны те же тенденции, что и при разделении на регионы (рис. 5-Д, Е).

Структура отношений между популяциями барабинских хомячков отражает в целом ту же картину, что и гаплотипическая структура комплекса. На деревьях (рис. 6) выделяется ветвь, содержащая два обособленных кластера, соответствующих кариоформам "griseus" и "pseudogriseus". Кариоформа "barabensis" представлена несколькими кластерами, из которых приморская популяция занимает базальное положение либо по от-

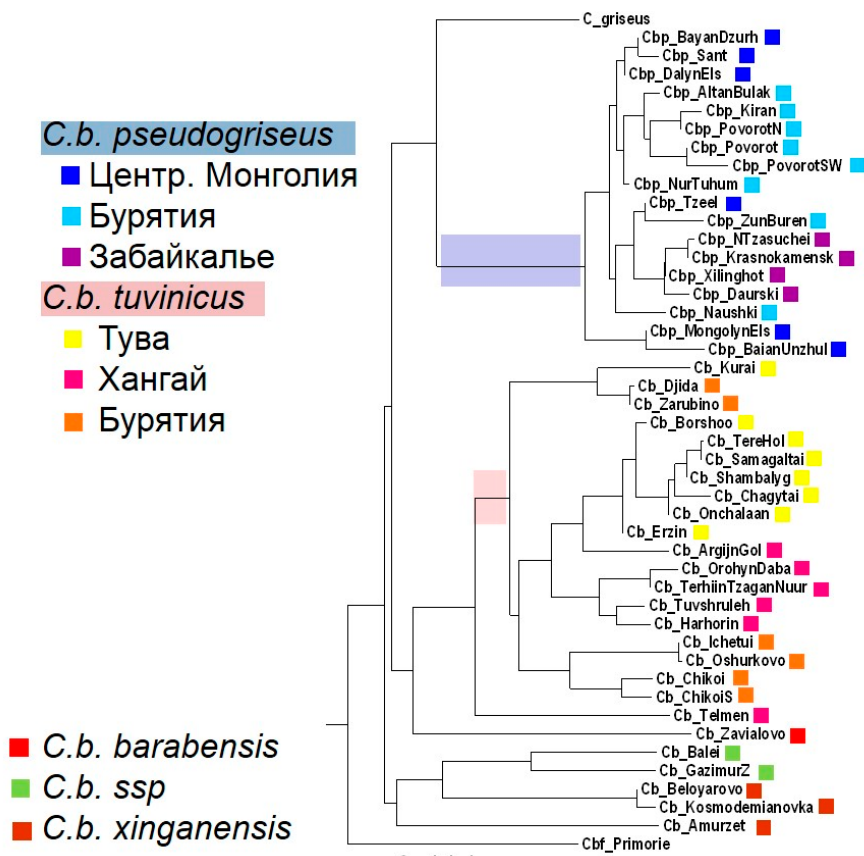


Рис. 6. NJ-дендрограмма, построенная по Fst-дистанциям между популяциями (данные изменчивости *cytb*).

ношению к остальным популяциям этой кариоформы (net p-дистанции), либо оказывается базальной для всех трех кариоформ (Fst-дистанции). Популяции из Читинской обл. и Амурского региона группируются в единый кластер с неясными отношениями внутри него. Алтайская популяция по отношению к подвиду *C. b. tuvinicus* занимает либо дочернее (net p-дистанции) либо базальное (Fst-дистанции) положение. Внутри подвидов *C. b. pseudogriseus* и *C. b. tuvinicus* выделяется несколько кластеров, однако их популяционный состав не согласуется с географической структурой.

3.4 Анализ изменчивости микросателлитов

Уровень как ожидаемой (H_e), так и наблюдаемой (H_o) гетерозиготности у кариоформы “barabensis” оказался ниже аналогичных показателей для кариоформы “pseudogriseus”. Среднее число аллелей в популяциях отличается у двух кариоформ не так сильно, но все же оно ниже у “barabensis”. Здесь следует отметить, что самый высокий показатель среднего числа аллелей у этой кариоформы обнаружен в популяции Хархорин. Также наблюдается небольшое снижение этого показателя в популяциях из таких регионов, как Алтай, Чита, Амур – краевые регионы кариоформы “barabensis”. Аналогично в этих популяциях заметно снижение показателей гетерозиготности. Кроме того гетерозиготность очень невысока в популяции Курай из Тувы (подвид *C. b. tuvunicus*).

У формы “pseudogriseus” во всех популяциях и регионах все вышеперечисленные показатели разнообразия оказались достоверно выше, чем у формы “barabensis” (тест Mann-Whitney, $P < 0.01$).

При исследовании отношений между географически близкими группами популяций путем построения NJ-деревьев, как по дистанциям Ней

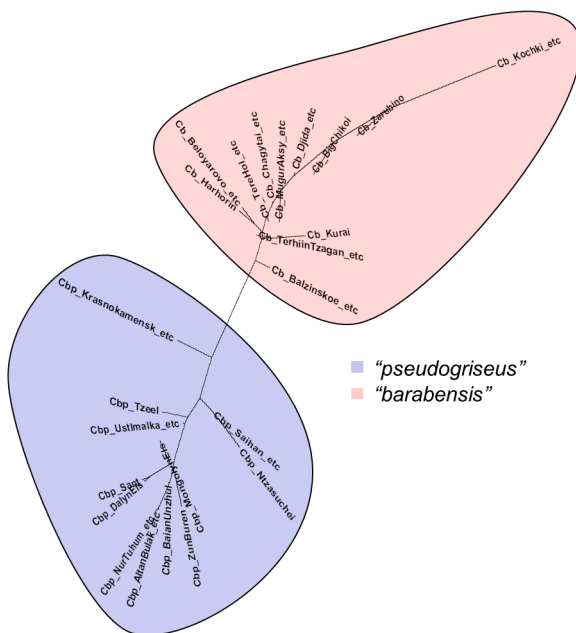


Рис. 7. NJ-дендрограмма, отражающая отношения между группами популяций, построенная по дистанциям Ней, скорректированным на размер выборки.

(рис. 7), так и по Fst-дистанциям выделяются два хорошо дифференцированных кластера, соответствующих кариоформам “barabensis” и “pseudogriseus”. Также выделяется обособленная ветвь, соответствующая выборке формы “barabensis” с Алтая (подвид *C. b. barabensis*).

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

Уровень дивергенции кариоформ и подвидов, согласно различным концепциям вида. Если следовать диагностическим критериям, предложенным Р. Бэйкером и Б. Брэдли (2001) в генетической концепции вида, то различия между тремя самыми крупными ветвями группы барабинских хомячков – 1. *C. b. barabensis* + *C. b. tuvinicus* + *C. b. ssp* + *C. b. xinganensis*; 2. *C. b. ferrugineus*; 3. *C. b. pseudogriseus* + *C. b. griseus* – могут соответствовать как подвидовому, так и видовому уровню. Однако с учетом дистанций по *cytb* между другими видами и подвидами хомячков Палеарктики (Neumann et al., 2006), эти три ветви скорее стоит расценивать как подвиды.

Различия между кариоформами “pseudogriseus” и “griseus” оказываются немного ниже видового уровня (от 2,7% по Bradley, Baker, 2001), так же, как и различия между группами *C. b. barabensis* + *C. b. tuvinicus* и *C. b. ssp* + *C. b. xinganensis*. А различия внутри этих групп оказываются также не выше подвидового уровня.

Таким образом, молекулярные данные в применении к численному критерию генетической концепции вида не позволяют с уверенностью определить статус какой-либо из выделяемой в комплексе барабинских хомячков групп как видовой, но для трех крупных линий не опровергают такую гипотезу.

В контексте классической типологической концепции вида кариоформы “barabensis”, “pseudogriseus” и “griseus” можно трактовать как три вида на основании их кариологической дифференциации, что и было некогда сделано (Малыгин и др., 1992).

Результаты лабораторной гибридизации также можно рассмотреть в свете типологической концепции вида, если считать, что успешная гибридизация в лаборатории с появлением жизнеспособных плодовитых гибридов обоего пола свидетельствует о невысоком уровне физиологической дивергенции, недостаточной для формирования механизмов посткопулятивной изоляции. Правда, следует отметить, что анализ синаптонемных комплексов лабораторных гибридов, полученных в процессе

данной работы, проведенный С.В. Матвеевским (Матвеевский и др., 2012), выявил единичные нарушения синапсиса хромосом. Такие результаты могут говорить о том, что цитогенетические механизмы изоляции между кариоформами уже начинают закладываться. Таким образом, уровень различий митохондриальной ДНК, кариотипов, краниометрических признаков и морфофизиологических особенностей позволяет рассматривать выделяемые в комплексе барабинских хомячков кластеры как подвиды. С другой стороны, по диагностическим критериям некоторых концепций вида, наличие хиатуса и хорошо дифференцированных кластеров по кариологическим и молекулярным параметрам дает возможность обсуждать и видовой статус ряда генетически дифференцированных групп этого комплекса.

Репродуктивная и генетическая изоляция у форм с уровнем дивергенции, аналогичным таковому у барабинских хомячков. Степень выраженности репродуктивной изоляции форм с генетическими различиями, соответствующими близким видам или подвидам, включает широкий спектр вариантов – от полной стерильности и/или нарушений жизнеспособности гибридов, до свободного скрещивания в лаборатории и в природе без видимого действия механизмов изоляции.

Если формы или близкие виды характеризуются небольшими различиями по кариотипам, морфологии и низким уровнем генетических различий, а отсутствие надежных механизмов изоляции подтверждено лабораторными опытами, то закономерно ожидать гибридизации в зонах контакта их природных популяций. Анализ литературы показывает, что существует немало примеров природной гибридизации между формами, уровень различий мтДНК которых сопоставим или выше, чем уровень различий между исследованными нами формами барабинских хомячков - «*barabensis*» и «*pseudogriseus*» (Ермаков и др., 2002; Титов и др., 2005; Hird, Sullivan, 2009; Hafner, 1992).

Распространение кариоформ и поиск следов гибридизации. Зарегистрированные нами новые точки обитания кариоформ «*pseudogriseus*» и «*barabensis*» в Южной Бурятии и Центральной Монголии существенно дополняют сведения о распространении хомячков в этих областях и, прежде всего, в зонах потенциального контакта.

Исходя из ранее опубликованных данных (Орлов, Исакова, 1975; Лебедев, Ковальская, 2003), можно было бы предположить, что форма

«*pseudogriseus*» заселяет на юге Бурятии только междуречье рек Чикой и Селенга, в то время как к западу от междуречья – на левом берегу Селенги, и к востоку – на правом берегу Чикоя, обитает форма «*barabensis*» (подвид *C. b. tuvinicus*). Полученные данные подтвердили это предположение, здесь кариоформы обитают по разным берегам р. Чикой, и результаты кариотипирования сократили минимальное расстояние между известными местообитаниями популяций разных кариоформ до 5 км. Учитывая особенности ландшафта, Чикой вряд ли может считаться серьезным географическим барьером для хомячков. Однако в этом районе мы не обнаружили совместного обитания кариоформ, хомячков с отклонениями в кариотипе, которые могли бы указывать на гибридизацию, а также следов интрогрессии гаплотипов *cyt b* или аллелей DBY1.

В Центральной Монголии наши данные и данные Лебедева В.С. и Ковальской Ю.М. (2003) указывают на то, что ареал формы «*barabensis*» занимает все Хангайское нагорье, кроме его восточной оконечности. р. Орхон не разграничивает ареалы форм – в верхнем течении на обоих берегах живет форма «*barabensis*», а ниже по течению – «*pseudogriseus*».

Среди исследованных локалитетов в Центральной Монголии район сомона Хархорин исходно рассматривался в качестве одной из зон потенциального контакта двух кариоформ. К западу от этой местности распространена только кариоформа «*barabensis*», а ближайший локалитет обитания кариоформы «*pseudogriseus*» находится в 50 км к востоку, в районе сомона Хашат /песков Монголын-Элс.

Кариологический анализ показал, что в окрестностях Хархорина распространена кариоформа «*barabensis*» ($2n=20$) (подвид *C. b. tuvinicus*). Однако в этой популяции были обнаружены два самца, в кариотипах которых представлена 21 хромосома. По числу и форме хромосом обнаруженный нами кариотип ($2n=21$) соответствует таковому гибрида второго или последующих поколений между «*barabensis*» и «*pseudogriseus*». Здесь следует отметить, что между популяцией из Хархорина и локалитетами Хашат-Монголын-Элс нет серьезных географических барьеров. Хотя в настоящее время кариоформы, по-видимому, обитают изолированно, возможно, что в период более широкого расселения хомячков ареалы двух форм соприкасались, в результате чего могли происходить единичные случаи гибридизации.

Анализ распределения гаплотипов *cytb* и аллелей DBY1 в зоне контакта в Центральной Монголии не выявил следов обмена этими маркера-

ми между кариоформами, также как и в зоне потенциального контакта в Забайкальском крае.

При этом результаты анализа распределения микросателлитных аллелей, позволяют предположить, что в ряде случаев исследованные хомячки оказались носителями аллелей другой кариоформы, т.е. были выявлены следы произошедшей некогда гибридизации.

Итак, по всем имеющимся данным две кариоформы хомячков – “barabensis” и “pseudogriseus” обитают аллопатрично, случаев истинной парапатрии (без каких-либо географических барьеров) или симпатрии не обнаружено. При этом действенность существующих между популяциями разных кариоформ географических преград в ряде случаев сомнительна. Выраженного потока генов между двумя кариоформами при этом не выявлено, хотя время от времени гибридизация, судя по всему, случается. Такие результаты не соответствуют изначальным ожиданиям, согласно которым формы животных с таким невысоким уровнем различий зачастую активно гибридизируют в природе. Согласно биологической и генетической концепциям вида, такое отсутствие следов активной гибридизации и выраженного потока генов может свидетельствовать о более высоком уровне дивергенции исследованных форм.

Историческая демография исследованных популяций

Проведенные исследования демографической стабильности популяций кариоформ “barabensis” и “pseudogriseus” дали в итоге очень схожие результаты: практически все исследованные популяции и группы популяций того или иного уровня объединения существуют на занимаемой ими территории достаточно давно и численность их на протяжении долгого времени оставалась (и остается) стабильно высокой. Исключение составляет только выборка хомячков с Алтая (подвид *C. b. barabensis*, самая западная часть ареала кариоформы “barabensis”), для которой можно предположить, что этот подвид возник относительно недавно, дифференцировавшись от подвида *C. b. tuvinicus*.

Поскольку стабильной эффективной численностью характеризуются по полученным результатам практически все популяции из зон потенциального контакта, отсутствие выраженного потока генов не удастся объяснить относительно недавним контактом, за время которого этот поток еще не успел сформироваться. Следовательно, генетическая изолированность кариоформ обуславливается какими-то другими механизмами. Возможно, в природе уже сформировались и действуют механизмы прекопуля-

ционной изоляции (химические, этологические), которые в большинстве случаев предотвращают гибридизацию в условиях свободного выбора полового партнера. Судя по всему, исследованные хромосомные формы хомячков – “barabensis”, “griseus” и “pseudogriseus” – эволюционируют независимо, и их дивергенция «в биологическом смысле» зашла дальше, чем можно было предположить по уровню морфологических и генетических различий.

ВЫВОДЫ

1. Между кариоформами “barabensis”, “griseus” и “pseudogriseus” на сегодняшний день не сформировались надежные механизмы физиологической (посткопуляционной) репродуктивной изоляции.

2. Ни в одной из трех известных областей, где возможен контакт кариоформ “barabensis” (подвид *C. b. tuvinicus*) и “pseudogriseus”, кариотипирование животных не обнаруживает перекрывания ареалов и/или гибридных зон. При этом в популяции формы “barabensis” из сомона Хархорин в Центральной Монголии обнаружены кариотипы предположительно гибридного происхождения.

3. При отсутствии следов обмена митохондриальной ДНК и Y-хромосомой в зонах потенциального контакта, результаты микросателлитного анализа можно интерпретировать как свидетельство интрогрессии аллелей формы “pseudogriseus” в популяцию формы “barabensis” из сомона Хархорин. Таким образом, при отсутствии выраженного потока генов можно предположить редкие случаи гибридизации между кариоформами.

4. Кариоформы “barabensis” и “pseudogriseus” выделяются в хорошо обособленные друг от друга группы как по митохондриальным, так и по микросателлитным данным.

5. Структурированность кариоформы “barabensis” по сравнению с “pseudogriseus” – как разделение ее на подвиды, так и дифференциация на географические регионы подвида *C. b. tuvinicus* может быть вызвана наличием большего числа географических преград на ареале, способствующих уменьшению потока генов между популяциями, а также несколько большим возрастом кариоформы.

6. На большей части исследованного ареала, в том числе в зонах потенциального контакта, популяции обеих кариоформ существуют достаточно давно и без сильных колебаний эффективной численности. Пред-

положить недавнюю экспансию можно только для алтайского подвида *C. b. barabensis*.

7. Несмотря на невысокий уровень различий по большинству исследованных параметров и успешную лабораторную гибридизацию, отсутствие выраженного потока генов между кариоформами “*barabensis*” и “*pseudogriseus*” в давно существующих зонах контакта может быть признаком наличия эффективных механизмов прекопуляционной изоляции, действующих в условиях свободного выбора полового партнера.

БЛАГОДАРНОСТИ:

Автор глубоко признателен всем, кто поддерживал его и помогал при выполнении этой работы: научным руководителям – Алексею Васильевичу Сурову и Анне Андреевне Банниковой; Лебедеву Владимиру Святославовичу за консультации и неоценимую методическую помощь на всех этапах работы; Малыгину Василию Михайловичу за руководство курсовой и дипломной работами, послужившими заделом данной диссертации; Рюрикову Георгию Борисовичу за помощь в сборе полевого материала, ценные советы и поддержку на всех этапах работы; Козловскому Александру Ивановичу; Мещерскому Илье Григорьевичу за методическую и практическую помощь в обработке материала; Феокистовой Наталье Юрьевне и коллективу кабинета молекулярных методов кафедры зоологии позвоночных биологического факультета МГУ, за ценные критические замечания и конструктивное обсуждение работы, родственникам и друзьям, которые оказывали моральную поддержку при сборе материала и написании работы.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах из перечня ВАК

Поплавская Н. С. Внутрипопуляционная изменчивость кариотипов хомячков группы *barabensis* (Cricetidae, Rodentia) из Центральной Монголии и возможные причины ее возникновения / Н. С. Поплавская, В. С. Лебедев, А. А. Банникова, В. М. Малыгин, А. В. Суров // Доклады Академии наук. – 2011. – Т. 439. – № 1. – С.139–141.

Поплавская Н. С. Новые данные о распространении хромосомных форм хомячков надвидового комплекса *Cricetulus barabensis* sensu lato (Rodentia, Cricetidae) и анализ репродуктивных барьеров между ними / Н. С. Поплавская, В. С. Лебедев, В. М. Малыгин, А. В. Суров, // Зоологический журнал. – 2012. – Т. 91. – № 8. – С. 1013–1022.

Поплавская, Н. С. Дивергенция кариоформ в надвидовом комплексе *Cricetulus barabensis* sensu lato и их взаимоотношения в зонах природного контакта / Н. С. Поплавская, В. С. Лебедев, А. А. Банникова, И. Г. Мещерский, А. В. Суров // Журнал общей биологии. – 2012. – Том 73. – № 3. – С. 183–197.

Материалы конференций:

Виноградова (Поплавская), Н.С. Гибридизационный анализ группы хомячков *Cricetulus barabensis* s.l. / Н.С. Виноградова (Поплавская), В.С. Лебедев, А.В. Суров // Материалы конференции «Актуальные проблемы экологии и эволюции в исследованиях молодых ученых». – Москва, 2007. – С. 83–86.

Виноградова (Поплавская), Н.С. Гибридизационный анализ группы хомячков *Cricetulus barabensis* s.l.: предварительные данные / В.С. Лебедев, Н.С. Виноградова (Поплавская), А.В. Суров // Териофауна России и сопредельных территорий. Материалы VIII международного съезда Российского териологического общества. – Москва, 2007. – С. 253.

Poplavskaya, N. S. Taxonomic status of three forms of hamster group *Cricetulus barabensis* sensu lato by phylogeographic and hybridization analysis / Vladimir S. Lebedev, Natalia S. Poplavskaya, Anna A. Bannikova, Marina V. Pavlenko, Vladimir P. Korablev and Alexey V. Surov // Abstracts of 11-th International conference “Rodens et Spatium” on rodent biology. – Myshkin, 2008. – P. 187.

Поплавская, Н.С. Уровень дивергенции аллопатрично распространенных кариоформ хомячков группы «barabensis» (Rodentia, Cricetidae,

Cricetulus) с точки зрения биологической концепции вида / Н.С. Поплавская // Современные проблемы зоо- и филогеографии млекопитающих. – Пенза, 2009. – С. 77.

Poplavskaya, N. S. Phylogeographic and hybridization analysis of three forms of hamster group *Cricetulus barabensis* sensu lato / Natalia S. Poplavskaya // Abstracts of 15-th European meeting of PhD students in evolutionary biology. – Schorle, 2009. – P. 65.

Poplavskaya, N. S. Complex analysis of systematic relationships in group ‘*Cricetulus barabensis* sensu lato’ / Natalia S. Poplavskaya, Vladimir S. Lebedev, Anna A. Bannikova, Aleksey V. Surov // Abstracts of 12-th International conference “Rodens et Spatium” on rodent biology. – Zonguldak, 2010. – P. 41.

Poplavskaya, N. S. Genetic structure and formation of reproductive barriers in *Cricetulus barabensis* sensu lato. / Natalia S. Poplavskaya, Vladimir S. Lebedev, Anna A. Bannikova, Aleksey V. Surov // VI-th European Congress of Mammalogy: Abstract volume. – Paris, 2011. – P 28.

Поплавская, Н.С. Генетическая структура и формирование репродуктивных барьеров в надвидовом комплексе *Cricetulus barabensis* sensu lato / Н.С. Поплавская, В.С. Лебедев, А.А. Банникова, А.В. Суров // Материалы международной конференции «Проблемы популяционной и общей генетики». – Москва, 2011. – С. 83

Поплавская Н.С. Исследование синаптонемных комплексов у кариоморф и гибридов группы барабинских хомячков рода *Cricetulus* / С.Н. Матвеевский, О.Л. Коломиец, В.С. Лебедев, В.М. Малыгин, Н.С. Поплавская, А.В Суров // Материалы международной конференции “Хромосома 2012”. – Новосибирск, 2012. – С. 137–138.

Заказ № 34573/ Подписан в печать 07.11.2013. Тираж 100 экз. Усл. п.л.1,6

ИП Золотаревская А.С. тел. (495) 649-83-30
e-mail: zolotarevskaja@cfr.ru